

UNIVERSITA' DI PADOVA



FACOLTA' DI INGEGNERIA

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Tesi di Laurea in
Ingegneria Biomedica

SVILUPPO DI UN NUOVO DISPOSITIVO PER IL TRATTAMENTO DELL'OSTEOARTRITE

Relatore: Ch.mo Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Dott. Francesco Segatti

Laureanda: Pavan Fabiana

Anno Accademico 2009/2010

Abstract:

Lima Lto, azienda che opera nel settore bio-medicale, ha condotto un progetto di ricerca per lo sviluppo di un idrogel per il trattamento dell'osteoartrite, la forma più comune di affezione articolare di tipo infiammatorio, caratterizzata dall'erosione progressiva della cartilagine. A partire dall'individuazione del polisaccaride di base da utilizzare, la carbossimetilcellulosa, il progetto si è sviluppato nell'individuazione di un processo di sintesi dell'idrogel a partire dal polisaccaride modificato, la Carbossimetilcellulosa ammidata, nella definizione delle varie fasi di produzione del dispositivo e in molteplici prove sperimentali volte alla caratterizzazione chimico-fisica del prodotto nonché alla valutazione della sua biocompatibilità ed efficacia terapeutica.

Indice

Introduzione	1
1. I dispositivi medici: cenni regolamentatori	4
2. Il ginocchio	8
2.1 La cartilagine articolare	10
3. L'osteoartrite.....	12
3.1 Tecniche di trattamento dell'osteoartrite	15
4. La viscosupplementazione con Acido Ialuronico	17
4.1 Limiti di applicabilità della viscosupplementazione	21
5. Un nuovo biomateriale	23
5.1 Cellulosa e modifiche funzionali.....	24
5.2 La carbossimetilcellulosa (CMC)	25
6. Processo di sintesi dell'idrogel di CMCA	28
6.1 Ammidazione.....	29
6.2 Purificazione polimero	30
6.3 Concentrazione	33
6.4 Reticolazione	34
6.5 Purificazione gel	36
6.6 Liofilizzazione	36

7. Caratterizzazione dell'idrogel di CMCA	38
7.1 Spettroscopia infrarossa	38
7.2 Spettrofotometria UV	42
7.3 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)	46
7.4 Rigonfiamento	47
7.5 Caratterizzazione meccanica	48
7.6 Valutazione del comportamento sotto carico dell'idrogel.....	57
7.7 Valutazione del coefficiente d'attrito dell'idrogel.....	72
8. Biocompatibilità.....	80
8.1 Prove in vitro	81
8.2 Prove in vivo.....	83
9. Sterilizzazione e Packaging.....	95
9.1 Sterilizzazione mediante calore	96
9.2 Sterilizzazione mediante gas (EtO)	98
9.3 Sterilizzazione mediante radiazioni.....	99
9.4 Packaging primario	99
9.5 Packaging in siringa	102
10. Conclusioni.....	105
Bibliografia	107

Introduzione

Il presente lavoro di tesi è frutto di un'attività di stage svolta presso l'azienda LIMA LTO S.p.A., società innovativa che opera da anni nel settore bio-medicale sui mercati internazionali.

L'azienda, costituita nel dicembre 1985, fa parte del gruppo LIMA, la cui attività era iniziata nel 1947 con la produzione di strumenti chirurgici e si è poi sviluppata nella produzione di componenti metallici per l'industria aereo spaziale, per l'industria automobilistica e dal 1972 di protesi articolari ortopediche.

Il settore di attività predominante di LIMA LTO è la ricerca, progettazione, produzione e distribuzione di sistemi di protesi ortopediche, settore basato su una tecnologia avanzata e in continua evoluzione, a carattere internazionale, nel quale l'azienda ricopre un ruolo di reale competitività.

Le sedi di ricerca e produttive sono situate in Friuli a Villanova di San Daniele del Friuli (UD) (Figura 1) dove sono sviluppate le tecnologie metallurgiche, chimiche, biomeccaniche, di decontaminazione e confezionamento delle artroprotesi, e dal 2004 in Sicilia per lo sviluppo di lavorazioni di superfinitura, di rivestimenti bioattivi e microfusione ad elettroni di micro polveri di Titanio. A queste si aggiungono filiali in Spagna, Francia, Repubblica Ceca, Croazia, Svizzera, Giappone, Austria, Slovacchia e

Olanda e una serie di distributori il cui contributo forma una fitta rete commerciale che si estende anche in Australia, Asia e Sud America.



Figura 1: Lo stabilimento di Villanova di San Daniele del Friuli (UD)

La Società, tra le varie attività di cui si occupa, ha per oggetto lo svolgimento di ricerche scientifiche e tecnologiche al fine di ottenere nuovi prodotti, nuove tecnologie e nuovi processi; nel settore bio-medicale i principali prodotti che tratta sono impianti ortopedici, sistemi ed accessori per trauma, strumentari chirurgici per l'impianto delle protesi e biomateriali.

Proprio in quest'ultimo ambito rientra il progetto di ricerca riportato in questa tesi.

L'intento di Lima è volto a far fronte alle sempre maggiori esigenze provenienti dal mondo dell'ortopedia e particolare attenzione viene posta nella cura e nel trattamento operatorio delle patologie degenerative e traumatologiche a carico delle ossa e delle articolazioni; vi è inoltre un estremo interesse nello sviluppo di tecnologie e tecniche d'intervento sempre meno invasive, meno dolorose e che tendano a migliorare la qualità della vita dei pazienti protesizzati. Particolari risorse vengono spese nella ricerca e nell'ottimizzazione di biomateriali che oltre a non danneggiare i tessuti circostanti la sede d'impianto, favoriscano anche la ricrescita cellulare e l'integrazione del dispositivo impiantato.

In questo senso, partendo dalla conoscenza, dimostrata da dati clinici, da una parte degli effetti positivi dell'applicazione di opportuni gel su protesi prima dell'impianto e dall'altra dell'elevata biocompatibilità e l'importante ruolo nel

signalling cellulare dei polisaccaridi, già largamente utilizzati in ambito biomedico, Lima si è proposta di sviluppare un processo pilota per la produzione di un innovativo gel a base di carbossimetilcellulosa modificata da utilizzare come dispositivo o scaffold cellulare per ricostruire tessuti danneggiati da patologie degenerative o traumi.

A partire dall'analisi delle proprietà richieste al nuovo dispositivo, il progetto di ricerca si è sviluppato nell'individuazione di un processo di sintesi del gel a partire dal polisaccaride modificato, nella definizione delle varie fasi di produzione e in molteplici prove sperimentali volte alla caratterizzazione chimico-fisica del prodotto nonché alla valutazione della sua biocompatibilità ed efficacia terapeutica.

Capitolo 1

I dispositivi medici: cenni regolamentatori

Oggetto di studio del progetto in questione è un materiale innovativo, un idrogel di un polisaccaride modificato, destinato all'utilizzo in diversi ambiti del settore biomedico. Risulta necessario, quindi, tener conto sin dall'inizio delle implicazioni che tale applicazione comporta dal punto di vista della sicurezza ed efficacia e quindi dei requisiti essenziali, formalizzati in direttive e normative riconosciute a livello comunitario, che il dispositivo deve soddisfare.

Al fine di dare una collocazione al dispositivo in questione si fa riferimento alla Direttiva 93/42/CEE del Consiglio del 14 giugno 1993, che all'Articolo 1 riporta la definizione di dispositivo medico: "dispositivo medico: qualsiasi strumento, apparecchio, impianto, sostanza o altro prodotto, utilizzato da solo o in combinazione, compreso il software informatico impiegato per il corretto funzionamento e destinato dal fabbricante ad esser impiegato nell'uomo a scopo di:

- diagnosi, prevenzione, controllo, terapia o attenuazione di una malattia;
- diagnosi, controllo, terapia, attenuazione o compensazione di una ferita o di un handicap;
- studio, sostituzione o modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico;
- intervento sul concepimento,

la cui azione principale voluta nel o sul corpo umano non sia conseguita con mezzi farmacologici né immunologici né mediante metabolismo, ma la cui funzione possa essere assistita da questi mezzi"

Sulla base della natura, dell'impiego, dello scopo e del meccanismo d'azione secondo cui l'idrogel è stato progettato, esso rientra nella definizione appena riportata. Quindi, essendo considerato dispositivo medico, ad esso è richiesto, come indicato nella direttiva sopracitata, di soddisfare alcuni requisiti essenziali relativi alla sicurezza dei pazienti ed utilizzatori, all'analisi dei rischi, alla minimizzazione dei rischi associati all'uso, alla garanzia delle prestazioni del dispositivo assegnate dal fabbricante e all'inalterabilità delle caratteristiche del dispositivo durante l'uso, il trasporto e l'immagazzinamento [Ministero della Salute, 2007].

Una serie di criteri e regole che dipendono dalla durata del contatto del dispositivo con il paziente, dall'invasività, dal tipo di funzionamento e dalla sede anatomica su cui incide il dispositivo, consentono la collocazione del dispositivo medico in una delle quattro classi di rischio crescente (I, IIa, IIb, III) proposte dal D.Lgs. 46/97 ; trattandosi di un dispositivo invasivo di tipo chirurgico con uso a lungo termine destinato ad avere un effetto biologico o subire modifica chimica nel corpo o a somministrare farmaci, l'idrogel rientra nella classe III come riportato in Figura 1.1.

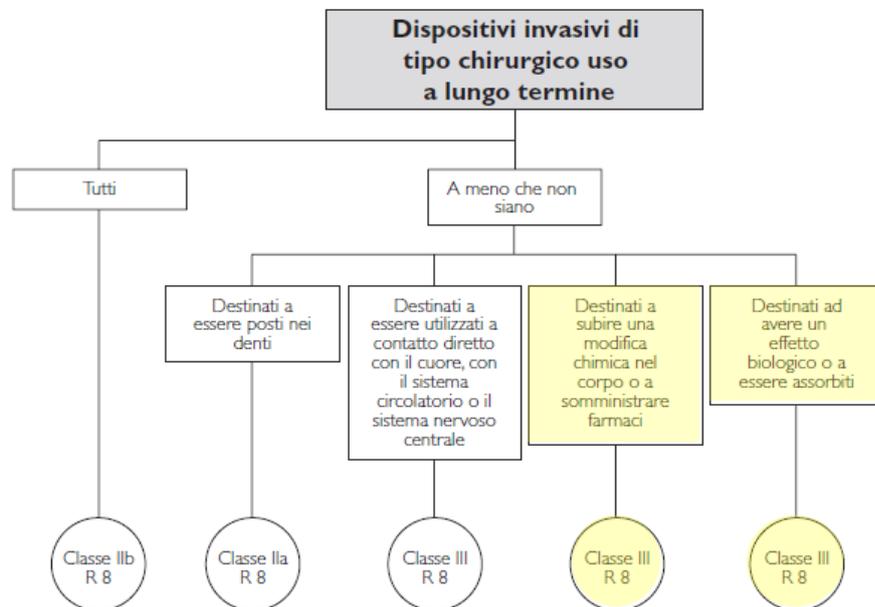


Figura 1.1: classificazione dei dispositivi medici invasivi di tipo chirurgico a lungo termine. L'idrogel del progetto rientra nella classe di rischio III.

Tra le caratteristiche che vengono richieste al dispositivo per garantire la sicurezza vi è la biocompatibilità, ovvero la non tossicità e la capacità di non indurre una risposta del sistema immunitario nell'organismo ospite: vi è quindi l'esigenza di eseguire test che valutino i potenziali effetti negativi durante l'uso reale del dispositivo e ne dimostrino o meno la biocompatibilità. L'estensione e la profondità del protocollo di test da seguire dipendono da numerosi fattori quali la natura del dispositivo, la destinazione d'uso, la natura dei componenti e le caratteristiche del contatto con i tessuti quanto a durata e natura.

Per i rischi collegati alla biocompatibilità si fa riferimento alle norme armonizzate e in particolare alle ISO 10993 – Valutazione biologica dei dispositivi medici: norme semiorizzontali quindi applicabili ad ampie famiglie di dispositivi, in continuo sviluppo e aggiornamento.

La ISO 10993-1 contiene i principi generali da applicare nella valutazione biologica dei dispositivi medici, la categorizzazione dei dispositivi quanto a natura e durata del contatto con i tessuti, e il processo di valutazione biologica composto dalla caratterizzazione di materiali e i test di valutazione biologica. Viene infatti fornito un criterio di selezione dei test tra quelli validati (citotossicità, sensibilizzazione, reattività intracutanea, tossicità sistemica, tossicità subacuta e subcronica, genotossicità, impianto, emocompatibilità, tossicità cronica, carcinogenicità, tossicità riproduttiva e dello sviluppo, biodegradazione) rimandando ad una descrizione dei metodi analitici nelle norme successive. Suggerisce, inoltre, sulla base delle caratteristiche del dispositivo, una valutazione specifica del numero e del tipo di test da applicare al dispositivo stesso (Tabella 1.1) [UNI EN ISO 10993-1:2004].

Nello sviluppo del progetto si è tenuto conto delle normative citate e, in previsione di un'attestazione di conformità, si è provveduto allo svolgimento di prove per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza dell'idrogel in base alle caratteristiche chimico-fisiche e alla sua destinazione d'uso, come verrà descritto in seguito.

Tabella 1.1: esempio di test per la valutazione della biocompatibilità suggeriti nella ISO 10993 per i dispositivi impiantabili.

Categorizzazione del dispositivo medico in funzione della			Effetto biologico								
Natura del contatto corporeo (vedere punto 4.2)		Durata contatto (vedere punto 4.3) A - Limitata (<24 h) B - Prolungata (da 24 h a 30 giorni) C - Permanente (>30 giorni)	Citotossicità	Sensibilizzazione	Irritazione o reattività intracutanea	Tossicità sistemica (acuta)	Tossicità subacuta e subcronica	Genotossicità	Impianto	Emocompatibilità	
Categoria	Contatto										
Dispositivo impiantabile	Tessuto/ossa	A	X	X	X						
		B	X	X	X	X	X	X	X		
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	
	Sangue	A	X	X	X	X	X			X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Capitolo 2

Il ginocchio

Il ginocchio è l'articolazione intermedia dell'arto inferiore ed è la più voluminosa del corpo umano; è costituita dall'estremità inferiore del femore che con i condili si adatta in basso alle cavità della tibia completate da due menischi, e per mezzo della troclea si mette in rapporto con la rotula. Si tratta quindi di una doppia articolazione condiloidea, unita ad una troclea.

Le superfici articolari del femore sono costituite da due condili (mediale e laterale) e dalla superficie patellare: i condili appaiono come spessi ovoidi divergenti inferiormente e posteriormente e le loro superfici variano gradualmente da una leggera curvatura anteriore ad una curvatura più accentuata posteriormente e sono separate dalla superficie patellare da un lieve solco.

Sulla faccia superiore della tibia vi sono due distinte aree ricoperte da cartilagine; la superficie del condilo mediale è più ampia e leggermente concava, mentre quella del condilo laterale è concava trasversalmente ma concavo-convessa antero-posteriormente. Le fosse delle superfici articolari sono rese più profonde dalla presenza di due menischi fibro-cartilaginei a forma di semilune, la cui presenza è fondamentale per attutire gli urti durante il movimento.

I segmenti ossei articolari adiacenti sono collegati dai legamenti (crociati e collaterali), formati come i tendini da collagene, la cui funzionalità primaria è quella di conferire stabilità ai movimenti agendo come veri e propri vincoli di mobilità (Figure 2.1, 2.2) [Petrone, 2009].

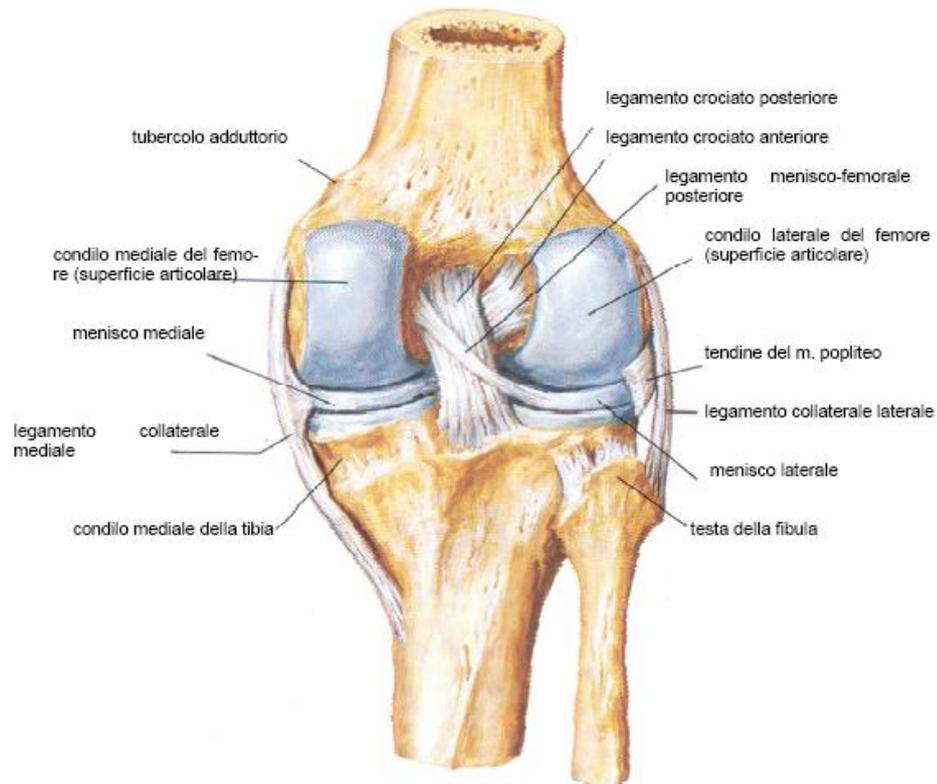


Figura 2.2: vista posteriore dell'articolazione di ginocchio destro.

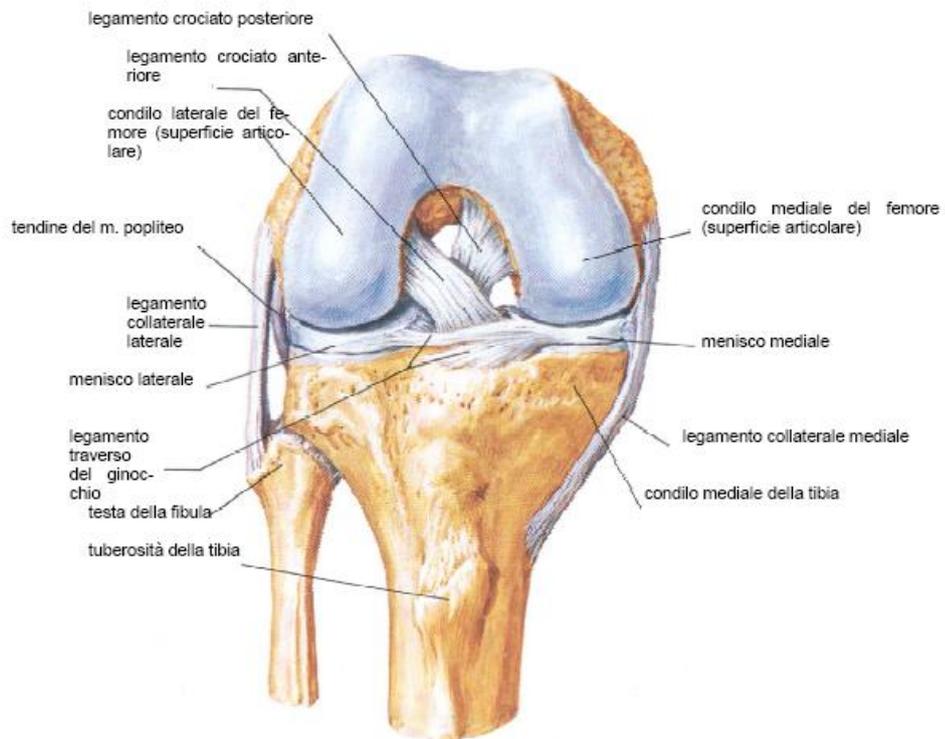


Figura 3.2: vista anteriore dell'articolazione di ginocchio destro.

L'articolazione del ginocchio rientra nel gruppo delle articolazioni sinoviali, le quali possiedono uno spazio articolare che permette un'ampia gamma di movimenti e la cui stabilità deriva da una densa capsula fibrosa rinforzata da legamenti e muscoli. I confini dello spazio articolare sono dati dalla membrana sinoviale che è saldamente ancorata alla capsula sottostante. Le cellule (sinoviociti) che costituiscono il rivestimento superficiale sono disposte in strati ed hanno funzione fagocitaria e di sintesi di acido ialuronico e proteine varie. Il rivestimento sinoviale manca di una membrana basale e si fonde con lo stroma del connettivo lasso sottostante che generalmente è ben vascolarizzato: questo permette un rapido ricambio tra sangue e liquido sinoviale. Il liquido sinoviale, di aspetto chiaro e viscoso, è costituito da un filtrato plasmatico contenente, tra le altre cose, acido ialuronico (HA) e, oltre ad agire come lubrificante, garantisce l'apporto nutritivo alla cartilagine ialina articolare [Robbins, 2000].

2.1 La cartilagine articolare

Tutte le superfici articolari sono rivestite da cartilagine: il tessuto cartilagineo appartiene ai tessuti connettivi di sostegno dotati di proprietà meccaniche. La cartilagine rappresenta una forma specializzata di tessuto, costituita da un unico tipo di cellule, denominate condrociti, immersi in un'abbondante matrice extracellulare (ECM), che occupano all'incirca il 2% del volume totale della cartilagine articolare normale nell'adulto. La componente maggiore dell'ECM è rappresentata dall'acqua che nel tessuto cartilagineo adulto rappresenta circa il 70% del peso totale ed è saldamente legata agli altri componenti macromolecolari del tessuto tra i quali collagene (50% del peso secco), proteoglicani (12% del peso totale della cartilagine articolare) e in piccole quantità lipidi e lipoproteine.

Esistono essenzialmente tre tipi di cartilagine: ialina (Figura 2.3), di cui è costituita principalmente la cartilagine articolare, elastica e fibrosa e tale classificazione è basata sulla prevalenza delle fibre presenti nella matrice intercellulare, costituite principalmente da collagene, e solo in alcuni casi da fibre elastiche [Buckwalter e Mankin, 1997].

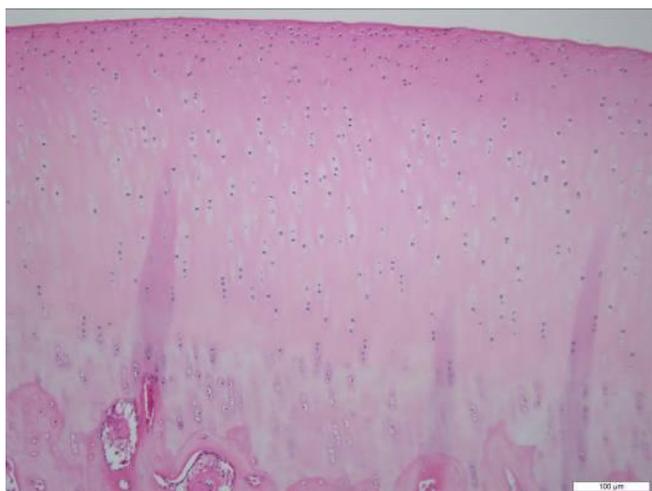


Figura 2.4: immagine al microscopio ottico di cartilagine ialina. La tecnica di colorazione H&E mette in risalto la distribuzione dei condrociti.

Grazie alla sua natura bifasica (“fase solida” costituita da proteoglicani, dal collagene e dai condrociti e “fase solubile” composta da acqua ed elettroliti) la cartilagine mostra un’ottima risposta biomeccanica agli stimoli fisiologici espletando le funzioni di assorbimento degli shock e di riduzione dell’attrito. La disposizione arciforme delle fibre di collagene e il loro orientamento orizzontale in prossimità della superficie, infatti, permette alla cartilagine di resistere a forze di trazione. Nel caso di carichi verticali, invece, è coinvolto il movimento del contenuto acquoso normalmente confinato dai proteoglicani legati all’acido ialuronico, che ha come conseguenza l’aumento della densità delle cariche negative e quindi delle forze repulsive intermolecolari che vanno a controbilanciare la sollecitazione esterna garantendo la resistenza alla compressione; inoltre fornisce alle articolazioni una straordinaria superficie di scorrimento che permette movimenti senza attrito [Robbins, 2000; Buckwalter e Mankin, 1997].

Capitolo 3

L'osteoartrite

E' dimostrato che, per le sue caratteristiche, la cartilagine articolare danneggiata esprime potenzialità di guarigione/riparazione molto limitate perché non possiede né vascolarizzazione né drenaggio linfatico; i condrociti, la cui funzione è di produrre i componenti della matrice e gli enzimi che la degradano, circondati da matrice extracellulare, sono al riparo dal riconoscimento immunologico e privi di collegamenti nervosi [Buckwalter e Mankin, 1997].

Le lesioni della cartilagine articolare, che possono anche essere associate ad alterazioni dell'osso subcondrale, rappresentano una patologia molto diffusa e possono essere di tipo traumatico o degenerativo.

La forma più comune di affezione articolare di tipo infiammatorio, caratterizzata dall'erosione progressiva della cartilagine, è l'**osteoartrite** (OA), nota anche come malattia degenerativa articolare (MDA); nei Paesi Occidentali essa è presente nella maggior parte delle persone sopra i 65 anni e in circa l'80% di quelle oltre i 75 anni [Council for Osteoarthritis Pain Management 2008]. Nonostante l'età sia il più diffuso fattore di rischio, l'insorgenza della patologia può essere riconducibile anche a fenomeni di usura meccanica e a sollecitazioni traumatiche che causano il rimodellamento dell'osso subcondrale compromettendone le proprietà meccaniche e quindi il funzionamento dell'articolazione stessa [Arokoski *et al.*, 2000; Dequeker *et al.*, 1995].

L'OA, infatti, può essere definita come un insieme eterogeneo di disturbi caratterizzato da una combinazione di sintomi articolari derivati da difetti nella cartilagine articolare e cambiamenti nei tessuti adiacenti, come l'osso, la capsula sinoviale articolare, i muscoli e i legamenti. I sintomi dell'OA del ginocchio includono dolore, ridotta funzionalità, gonfiore, rigidità mattutina, blocco/schiocco del ginocchio, instabilità dell'articolazione, atrofia muscolare, difficoltà di movimento [Council for Osteoarthritis Pain Management 2008].

È possibile individuare principalmente tre stadi nel progresso dell'OA: danno alla matrice della cartilagine, risposta dei condrociti al danno e diminuzione della sintesi del tessuto, e infine degenerazione del tessuto. Quando la cartilagine viene danneggiata, si assiste all'aumento del contenuto d'acqua nella matrice e alla diminuzione della concentrazione e della lunghezza delle catene di glicosamminoglicani (GAGs): questo comporta una maggior vulnerabilità del tessuto ad ulteriori sollecitazioni meccaniche. Successivamente entra in gioco l'azione dei condrociti che, rilevando alterazioni nella densità e nell'osmolarità, stimolano la risposta cellulare che consiste in un'attività sia anabolica che catabolica. Vi è, infatti, proliferazione dei condrociti che da un lato stimolano la sintesi di macromolecole della matrice, dall'altro, però, rilasciano mediatori che stimolano la produzione di metalloproteinasi cataboliche che inibiscono la sintesi di collagene e proteoglicani e sono coinvolte nella digestione delle lunghe catene di acido ialuronico. Quest'ultimo ha un ruolo fondamentale nel conferire proprietà viscoelastiche al fluido sinoviale, garantendo la capacità di trasmissione dei carichi, lubrificazione, e protezione delle estremità articolari; la riduzione del peso molecolare delle catene di HA comporta una diminuzione della viscoelasticità e quindi delle proprietà reologiche dell'articolazione.

Quando l'attività catabolica prevale di gran lunga su quella anabolica, si ha la degradazione completa della cartilagine articolare che lascia esposto l'osso subcondrale. Sulla superficie di quest'ultimo, che è soggetto a sclerosi e quindi aumento di densità, si ha la formazione di osteofiti, escrescenze rivestite da tessuto cartilagineo fibroso che ossifica progressivamente compromettendo la funzionalità dell'articolazione (Figura 3.1) [Buckwalter e Mankin, 1997].

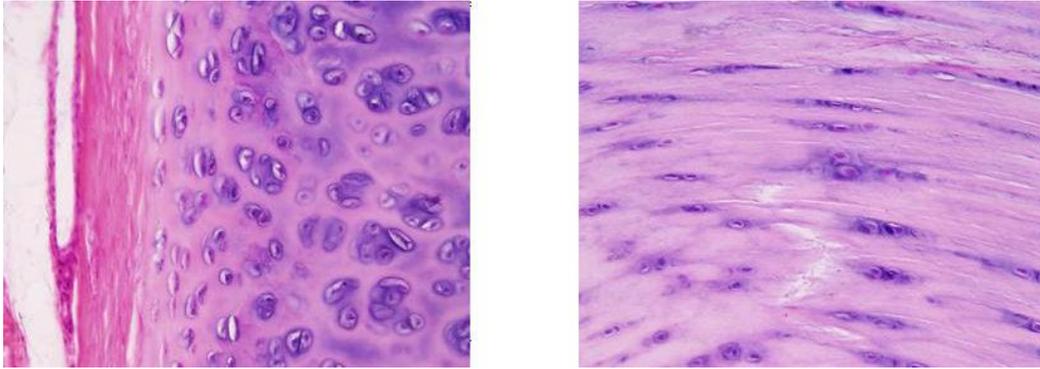


Figura 3.1: confronto tra cartilagine ialina (sinistra) e cartilagine fibrosa (destra).

A seconda delle modificazioni strutturali dell'articolazione individuabili mediante indagine radiografica (Figure 3.2, 3.3), è possibile stabilire una classificazione dell'osteoartrite per gradi di severità; uno dei primi sistemi di graduazione è quello fornito da Kellgren e Lawrence (1957):

- *Grado 0*: non vi sono modificazioni artrosiche;
- *Grado 1*: dubbio restringimento dello spazio articolare e minuta formazione di osteofiti;
- *Grado 2*: minime alterazioni, definita formazione di osteofiti e possibile restringimento dello spazio articolare ;
- *Grado 3*: moderate multiple formazioni osteofitosiche, definito restringimento dello spazio articolare e qualche sclerosi ossea;
- *Grado 4*: severo restringimento dello spazio articolare con marcata sclerosi, definita deformazione ossea, ampi osteofiti.



Figura 3.2: RX ginocchio sano.



Figura 3.3: RX ginocchio affetto da osteoartrite: sono evidenti la sclerosi spongiosa, la rima articolare assottigliata e la presenza di osteofiti.

L'analisi radiografica non è l'unica indagine strumentale applicabile nella diagnosi della patologia; altre tecniche, infatti, consentono un'esplorazione più approfondita dei diversi tessuti che compongono l'articolazione. L'ecografia evidenzia il versamento e l'ispessimento della capsula; la RMN evidenzia i disturbi della cartilagine articolare, i difetti condrali e le alterazioni di altre strutture; la TAC esamina il compartimento femoro-rotuleo, individuando eventuali corpi liberi intra-articolari, sublussazioni o dislocazioni della rotula, fratture del piatto tibiale. Infine vi è l'artroscopia diagnostica che identifica molti "disordini interni" del ginocchio come condromatosi ed altre patologie sinoviali mal accertabili con altri mezzi ed esamina la cartilagine articolare.

3.1 Tecniche di trattamento dell'osteoartrite

A seconda delle caratteristiche della lesione cartilaginea e del quadro clinico del paziente, sono oggi disponibili diverse tecniche di trattamento:

- *Lavaggio e debridement articolare*: tecnica eseguita in artroscopia che consiste nella rimozione dal ginocchio dei frammenti liberi intra-articolari (prodotti catabolici endoarticolari e cartilagine degenerata) che provocano dolore e infiammazione.
- *Tecniche di stimolazione del midollo osseo (p. es. microfratture secondo Steadman)*: in seguito al lavaggio dell'articolazione il difetto viene approfondito chirurgicamente sino alla penetrazione dell'osso subcondrale e la fuoriuscita di midollo osseo. Esso contiene cellule mesenchimali che hanno un'elevata

potenzialità rigenerativa e sono, quindi, in grado di riparare la cartilagine danneggiata (Figura 3.4).

- *Mosaicoplastica*: consiste nel prelievo di cilindri osteocondrali da zone di non carico del ginocchio e loro impianto nella zona degenerata per colmare il difetto cartilagineo.
- *Trapianto autologo di condrociti (tecnica ACI – Autologous Chondrocyte Implantation)*: consiste nella somministrazione nel sito della lesione di un liquido nel quale sono sospesi i condrociti autologhi (ossia condrociti del paziente espansi in vitro). Al fine di mantenere le cellule nella lesione viene applicata una pellicola (periostio) prelevata dalla superficie della tibia e cucita alla cartilagine sana a formare una “tasca” a tenuta ermetica.
- *Tecniche ACI di seconda generazione*: sviluppate con l'intento di migliorare la tecnica ACI, prevedono l'utilizzo di condrociti autologhi fatti proliferare su uno scaffold appositamente progettato in biomateriale biocompatibile e biodegradabile e non richiedono quindi l'utilizzo del periostio rendendo l'intervento chirurgico più semplice.
- *Viscosupplementazione*: basata sull'osservazione della riduzione della viscoelasticità del liquido sinoviale nel ginocchio osteoartritico, consiste nell'infiltrazione endoarticolare di un materiale iniettabile, in genere a base di acido ialuronico, al fine di rifornire la composizione del liquido sinoviale e migliorarne la funzionalità.

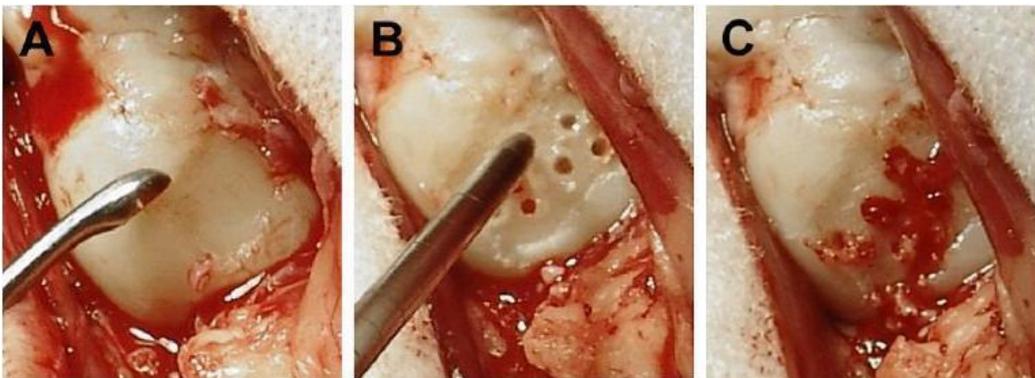


Figura 3.4: Trattamento di una lesione cartilaginea. Debridement (rimozione dei frammenti liberi) della cartilagine sino all'osso subcondrale (A), microfratture dell'osso subcondrale (B), sanguinamento del tessuto (C) per favorire l'apporto di cellule con potenzialità rigenerativa.

Capitolo 4

La viscosupplementazione con Acido Ialuronico

Il concetto di viscosupplementazione con acido ialuronico, ossia l'iniezione intra-articolare dello stesso per il trattamento dell'osteoartrite, è stato introdotto per la prima volta da Balazs e Denlinger negli anni '70 [Balazs e Denlinger, 1993] e nel 1997 tale pratica è stata approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) [Food and Drug Administration, 1997].

L'Acido Ialuronico (HA) è il principale glicosamminoglicano della sostanza fondamentale del tessuto connettivo: chimicamente è un polisaccaride formato dall'aggregazione di migliaia di unità disaccaridiche (Figura 4.1), costituite a loro volta da residui di acido glucuronico e N-acetilglucosamina, che si ripetono in una lunga catena lineare ad alto peso molecolare (2000-10000 kDa).

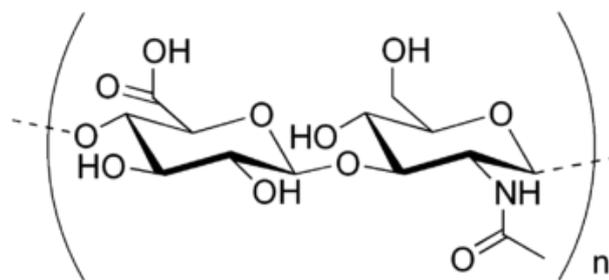


Figura 4.5: L'unità disaccaridica (acido glucuronico e N-acetilglucosamina) che si ripete nella struttura dell'acido ialuronico.

L'Acido Ialuronico svolge molteplici funzioni all'interno dell'organismo umano: a livello articolare, grazie alle sue caratteristiche viscoelastiche, agisce come

lubrificante, incrementando la viscosità del liquido sinoviale, e ammortizzante, consentendo la separazione delle superfici articolari sotto carico. L'HA possiede, inoltre, degli effetti condroprotettivi: ricopre la superficie articolare ed esercita protezione meccanica sui sinoviociti della cartilagine articolare, prevenendo il danneggiamento delle cellule da stress meccanico. Nella cartilagine articolare l'HA consente l'organizzazione dei proteoglicani in enormi aggregati che conferiscono al tessuto la caratteristica resistenza alla compressione e fungono da filtro contro la libera diffusione di molecole attraverso la membrana sinoviale. Il mantenimento della normale struttura dell'HA è essenziale per l'omeostasi dell'ambiente articolare e qualsiasi evento in grado di modificare le caratteristiche fisiologiche di questo polisaccaride può determinare gravi ripercussioni, funzionali prima ed anatomiche poi, a carico delle strutture articolari, costituendo, quindi, l'elemento cardine della patologia cartilaginea degenerativa o traumatica. È il caso dell'osteoartrite che causa una riduzione della concentrazione e del peso molecolare dell'acido ialuronico comportando così una riduzione dell'elasticità e della viscosità del liquido sinoviale e una ridotta funzionalità dell'articolazione.

Le prestazioni delle articolazioni, infatti, sono strettamente connesse con le proprietà viscoelastiche del liquido sinoviale, che determina la trasmissione dei carichi e permette la lubrificazione e la protezione della cartilagine articolare e delle superfici molli durante il funzionamento delle articolazioni. In un paziente sano il liquido sinoviale è altamente viscoso e questo garantisce sia la lubrificazione del sistema articolare sia la funzione di *shock absorber* del sistema, ovvero dissipa energia cinetica generata dai carichi dinamici agenti durante le varie attività giornaliere e attenua i carichi trasmessi alle ossa [Ogston e Stanier, 1953].

In realtà il liquido sinoviale non presenta un valore univoco di viscosità ma, essendo un materiale viscoelastico, non-newtoniano e dalla caratteristica prettamente pseudo-plastica, presenta viscosità variabile in base alla sollecitazione agente: per la precisione, diminuisce all'aumentare della velocità della deformazione (*shear rate*).

La caratteristica di viscoelasticità è evidenziata da prove reologiche che hanno dimostrato che il liquido sinoviale presenta un comportamento viscoso a basse frequenze (modulo viscoso G'' maggiore del modulo elastico G') e un comportamento

prevalentemente elastico ad altre frequenze ($G' > G''$); il limite tra le due regioni è rappresentato dalla frequenza di crossover ω_c , che si sposta verso frequenze sempre più alte con il degenerare della struttura. Lo spettro meccanico del liquido sinoviale di un giovane, infatti, presenta una frequenza di crossover più bassa e il valore assoluto di G' più alto, in tutto il range di frequenze, rispetto a quello di un anziano, in cui si ha una riduzione della concentrazione di HA e/o del suo peso molecolare. Nel caso dell'osteoartrite, il liquido sinoviale patologico presenta un comportamento viscoso in tutto il range di frequenze esaminato ($G'' > G'$) e si assiste anche ad una riduzione del valore assoluto dei moduli dinamici rispetto ai liquidi sinoviali normali (Figura 4.2).

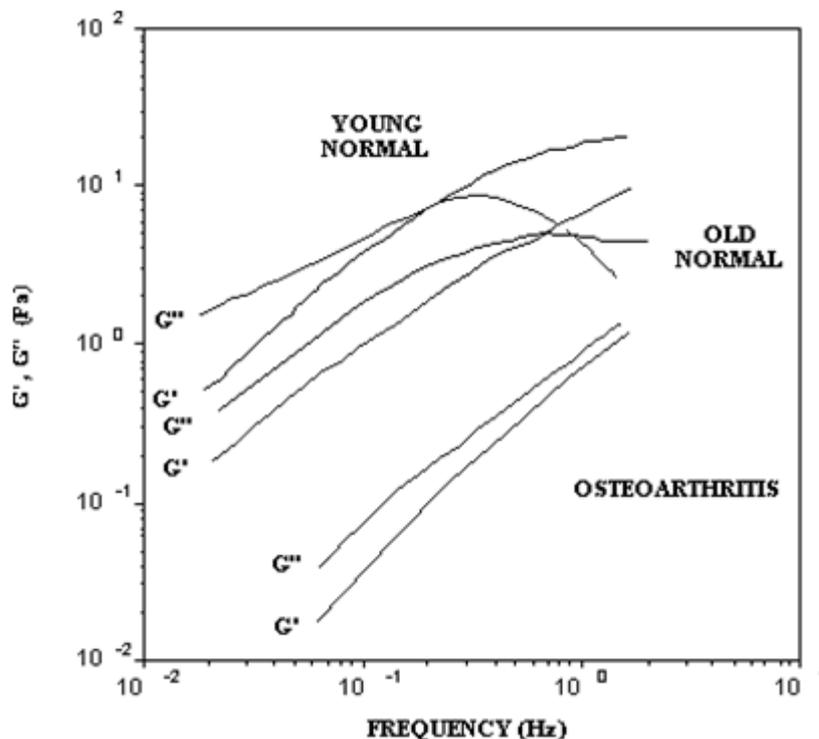


Figura 4.6: Andamento del modulo viscoso (G'') e del modulo elastico (G') del liquido sinoviale. Nel paziente sano a basse frequenze prevale il comportamento viscoso mentre alle alte frequenze prevale quello elastico; il limite è la frequenza di crossover ω_c . Il liquido sinoviale patologico ha comportamento viscoso in tutto il range con moduli dinamici inferiori.

Scopo della viscosupplementazione è cercare di limitare l'azione erosiva a carico delle superfici articolari indotta da una degenerazione in termini di elasticità e viscosità del liquido sinoviale. Al fine di ristabilire la viscoelasticità del fluido sinoviale la supplementazione prevede l'iniezione intra-articolare di Acido Ialuronico esogeno: è dimostrato come questo eserciti un'azione multifattoriale che va oltre la funzione

semplicemente lubrificante e riempitiva nello spazio extra-cellulare, ma abbia un effettivo impatto sulla progressione dell'OA. L'HA esplica il suo ruolo biologico all'interno di un complesso sistema di interazioni tra sintesi, degradazione, internalizzazione e legame con i recettori: esercita, infatti, attività antinfiammatorie, citoprotettive e immunoregolatorie, mediate da specifici recettori cellulari di superficie, con inibizione della produzione e dell'attività degli enzimi catabolici (metalloproteinasi) regolati dalle citochine proinfiammatorie, prodotte dal tessuto sinoviale osteoartritico e dimostra, inoltre, attività analgesiche mediante l'interferenza con i neuropeptidi liberati dalle cellule sinoviali attivate [Frizziero *et al.*, 1998; Goldberg e Buckwalter, 2005].

Il meccanismo d'azione dell'Acido Ialuronico esogeno iniettato è notevolmente influenzato dal peso molecolare dello stesso: per l'HA a basso/medio peso molecolare prevale l'attività biologica, mentre l'HA ad alto peso molecolare risulta migliore nell'esplicare l'attività reologica e analgesica [Maneiro *et al.*, 2004]. In particolare si è visto come l'Acido Ialuronico, così come altre componenti proteiche del liquido sinoviale (collagene e fibronectina) [Clark *et al.*, 1988; Laskin *et al.*, 1994], eserciti azioni diametralmente opposte in funzione dello stato in cui si trova. Se da un lato gli alti pesi molecolari garantiscono l'efficienza del fluido sinoviale, dall'altro i frammenti a basso peso molecolare (inferiore a $0.5 \cdot 10^6$ Da) [Ghosh e Guidolin, 2002] agiscono come marcatori di un processo degenerativo e diventano dei veri e propri mediatori chimici pro-infiammatori [McKee *et al.*, 1996].

Attualmente in commercio esistono diverse formulazioni di Acido Ialuronico iniettabili approvati per il trattamento dell'osteoartrite al ginocchio, tra i quali Synvisc® (Genzyme Corporation, Cambridge, MA), Hyalgan® (Fidia Farmaceutici Spa, Abano Terme, Padova), Supartz® (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan), Orthovisc® (Anika Therapeutics Inc., Woburn, MA) e Euflexxa™ (Ferring Pharmaceuticals Inc., Parsippany, NJ). Questi preparati si differenziano tra loro per origine, modalità di produzione, peso molecolare, emivita nel liquido sinoviale, proprietà reologiche, farmacodinamica e costi (Tabella 4.1).

Tabella 4.1: Principali formulazioni di Acido Ialuronico per la viscosupplementazione disponibili in commercio

	Produttore/ Distributore	PM (kD)	Origine	Forma	%	Siringa	Posologia
<i>Orthovisc®</i>	Anika Therapeutics/ Depuy-Mitek (J&J)	1200-2900	Animale	Polimero	1.5	2 ml	1 iniez./sett. per 3 sett.
<i>Euflexxa®</i>	Ferring Pharmaceuticals	2400-3600	Biotech	Polimero	1.0	2 ml	1 iniez./sett. per 3 sett
<i>Artz- Supartz®</i>	Seikagaku corporation / Smith & Nephew	620-1170	Animale	Polimero	1.0	2.5 ml	1 iniez./sett. per 5 sett
<i>Hyalgan®</i>	Fidia / Sanofi Synthelabo	500-730	Animale	Polimero	1.0	2 ml	1 iniez./sett. per 5 sett
<i>Synvisc®</i>	Genzyme	6000	Animale	Polimero + gel	0.8	2 ml	1 iniez./sett. per 3 sett
<i>Sinovia®</i>	IBSA istitute Biochimique SA	800-1200	Animale	Polimero	0.8	2 ml	1 iniez./sett. per 5 sett
<i>Jointex®</i>	Documedita SA / Chiesi	800-1200	Biotech	Polimero	0.8	2 ml	1 iniez./sett. per 5 sett
<i>Durolane®</i>	Q-Med	*	Biotech	Gel	1.5	3 ml	1 iniezione

4.1 Limiti di applicabilità della viscosupplementazione

Nonostante i prodotti commerciali trovino largo utilizzo in campo ortopedico e traumatologico, studi clinici hanno dimostrato che in alcuni casi (dall'1% all'11%) [Martens, 2001] nelle 24-48 ore seguenti l'intervento di viscosupplementazione, il paziente sviluppa reazioni di tipo infiammatorio con comparsa di dolore all'articolazione interessata, gonfiore ed eritema [Arrich *et al.*, 2005].

Non è stato stabilito in modo certo quali siano le cause di tali sinoviti post-iniezione che si presentano raramente in seguito al primo intervento, ma la cui frequenza aumenta notevolmente dopo la seconda iniezione e i cicli successivi. Per alcuni sono da attribuire alla tecnica di iniezione stessa [Lussier *et al.*, 1996; Allen e

Krohn, 2000], ma non vi sono prove certe che sostengano tale tesi; è più probabile, invece, che si tratti di reazione da corpo estraneo o da ipersensibilità verso alcuni componenti proteici presenti nel prodotto iniettato [Martens, 2001; Puttick *et al.*, 1995].

Anamnesi approfondite dei pazienti che presentano tali reazioni dimostrano l'assenza di febbre e l'analisi del liquido sinoviale non evidenzia la presenza di batteri, di cellule infiammatorie e di cristalli di pirofosfato di calcio in cavità articolare. In alcuni casi sono stati notati fenomeni infiammatori come la CPPD (patologia da deposizione di cristalli di calcio pirofosfato) e, nonostante vi fosse il sospetto che il sistema tamponante della soluzione, costituito da pirofosfati, potesse aver influito sulla precipitazione del sale, in realtà non sembra comunque che tali fenomeni siano dovuti direttamente alla somministrazione di HA [Puttick *et al.*, 1995].

Si deduce quindi che le reazioni infiammatorie indotte dalla viscosupplementazione siano di tipo immunitario non anafilattico e quindi che siano legate a ipersensibilità del paziente verso l'Acido Ialuronico iniettato; in particolare, trattandosi di un prodotto di origine aviaria (creste di gallo) o derivante da biofermentazione, la componente antigenica potrebbe essere rappresentata da tracce proteiche presenti nell'iniettabile anche dopo uno spinto processo di purificazione.

Studi specifici, inoltre, hanno dimostrato che la degradazione delle catene polimeriche di HA ad opera degli enzimi sinoviali genera frammenti a basso peso molecolare che fungono da mediatori pro-infiammatori [Aruffo, 1996]. Se, quindi, il limite principale della viscosupplementazione a base di Acido Ialuronico relativamente alla sicurezza è l'origine stessa dell'HA iniettato, per il rischio di ipersensibilità verso il prodotto, dal punto di vista dell'efficacia il limite è rappresentato dalla durata d'azione dell'Acido Ialuronico esogeno che risulta ridotta a causa della sua rapida degradabilità. Questo rende necessarie ripetute iniezioni, aumentando il rischio di intollerabilità e reazioni avverse e allo stesso tempo incidendo in modo pesante su un'altra problematica costituita dall'elevatissimo costo del polisaccaride utilizzato.

Capitolo 5

Un nuovo biomateriale

All'interno di una politica di continua innovazione e ricerca di miglioramenti in campo bio-medicale, Lima Lto si è proposta di sviluppare un nuovo dispositivo per il trattamento dell'osteoartrite alternativo all'Acido Ialuronico iniettabile. In particolare, al fine di superare le problematiche correlate all'utilizzo dell'HA precedentemente riportate, l'azienda ha investito notevoli risorse in un progetto di ricerca finalizzato all'individuazione e alla caratterizzazione di un gel innovativo adatto alla viscosupplementazione.

L'attività di stage presso la sede di Lima Lto di Villanova è stata svolta proprio nell'ambito di questo progetto, con particolare riferimento alle fasi di produzione e caratterizzazione che costituiscono una parte dell'intera ricerca tutt'ora in via di sviluppo.

Lima Lto si è inizialmente occupata della ricerca di un polimero dal comportamento simile all'Acido Ialuronico ma facile da reperire, a basso costo, di origine non animale e chimicamente stabile. Dopo un'approfondita ricerca bibliografica e diverse valutazioni sulle caratteristiche richieste al polimero e sui prodotti già presenti nel mercato, la scelta è ricaduta su un polisaccaride ampiamente diffuso: la cellulosa; in particolare l'attenzione è stata rivolta ad un suo derivato, la carbossimetilcellulosa, che opportunamente modificata mediante ammidazione e reticolazione, ha dimostrato di possedere i requisiti richiesti.

5.1 Cellulosa e modifiche funzionali

La cellulosa è la sostanza organica più abbondante in natura; è la componente strutturale delle piante superiori ed è presente in tutte le loro parti. Dal punto di vista chimico si tratta di un polisaccaride costituito dalla ripetizione di parecchie centinaia di unità di D-glucosio unite da legami glicosidici $\beta(1,4)$ a formare una lunga catena lineare (Figura 5.1).

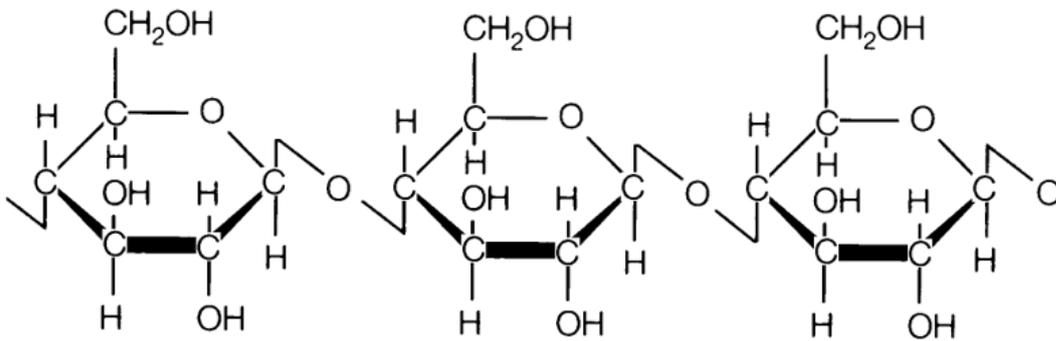


Figura 5.7: Struttura della cellulosa costituita da una catena lineare di unità di D-glucosio

La presenza di molteplici funzioni ossidriliche consente la formazione di legami a idrogeno tra molecole di catene adiacenti che, fortemente vincolate tra loro, costituiscono strutture dotate di proprietà cristalline e conferiscono alla cellulosa forza e rigidità.

La cellulosa è stato il primo polimero naturale che sia stato modificato chimicamente per fornire nuovi materiali utili all'uomo: i gruppi ossidrilici liberi, infatti, possono reagire con altri composti e trasformarsi in gruppi funzionali differenti. Qualunque processo venga realizzato, esso provoca una parziale degradazione delle molecole di cellulosa e le trasforma in derivati molto più solubili nei solventi organici; in questa forma solubile si possono lavorare, in forma di fili o di fogli sottili, che a contatto di altre soluzioni solidificano oppure subiscono reazioni chimiche inverse di quelle originali, che rigenerano la cellulosa in una forma nuova più conveniente [Ege, 1994].

È possibile ottenere, in questo modo, svariati derivati della cellulosa con proprietà differenti e idonee all'uso voluto: tra i più importanti derivati commerciali vi sono gli esteri e ed eteri di cellulosa.

5.2 La Carbossimetilcellulosa (CMC)

La carbossimetilcellulosa (CMC) è un etere di cellulosa, prodotto dalla reazione della cellulosa con alcali e con monocloroacetato di sodio sotto condizioni rigidamente controllate. Si tratta, quindi, di una lunga catena costituita da unità glucidiche nelle quali l'idrogeno di alcune funzioni ossidriliche è sostituito da gruppi carbossilici (Figura 5.2).

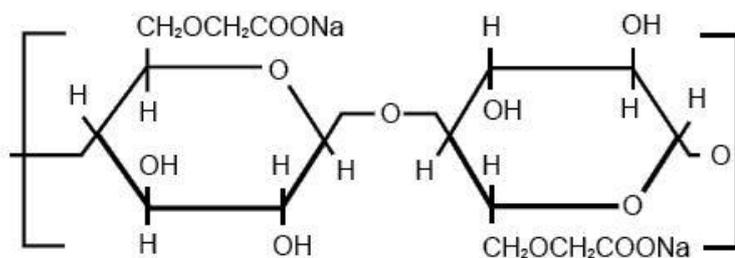


Figura 5.8: Struttura della carbossimetilcellulosa (CMC): alcune funzioni ossidriliche delle unità glucidiche sono sostituite da gruppi carbossilici.

Ogni molecola di glucosio contiene tre gruppi ossidrilici liberi disponibili per la sostituzione, tuttavia è impossibile che nella pratica essi vengano tutti coinvolti nella reazione, perciò il numero medio di gruppi sostituiti per ogni unità glucidica, definito "grado di sostituzione" (DS) è sempre inferiore a 3. Ottima solubilità in acqua e altre auspicabili proprietà fisiche della CMC sono ottenute ad un grado di sostituzione molto inferiore a 3: valori tipici di DS per la CMC commercializzata variano nell'intervallo 0.60-0.90.

Trattandosi di un polimero, un altro parametro importante è il peso molecolare: esso dipende, oltre che dal grado di sostituzione, anche dal grado di polimerizzazione, ossia dalla lunghezza media della catena polimerica e influenza notevolmente la viscosità della soluzione di CMC.

La CMC è spesso usata per viscosizzare, sospendere, stabilizzare, gelificare o modificare la fluidità di soluzioni o sospensioni acquose. Tali soluzioni sono

sottoposte, durante la preparazione e l'uso, ad un ampio intervallo di condizioni di carico, perciò assume rilevante importanza il loro comportamento reologico che è fortemente dipendente dalla viscosità della soluzione stessa. Le soluzioni di CMC possono essere definite come liquidi pseudo-plastici in quanto la loro viscosità apparente diminuisce all'aumentare della velocità di deformazione, ma l'effetto è totalmente reversibile una volta cessata la sollecitazione (Figure 5.3, 5.4).

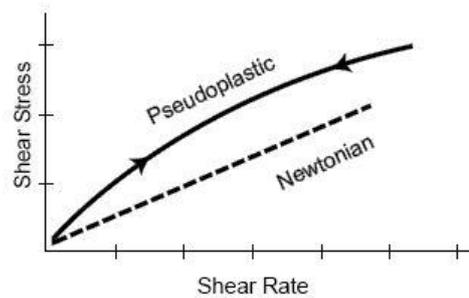


Figura 5.9: Andamento dello sforzo di taglio (shear stress) in funzione della velocità di deformazione (shear rate): a differenza dei liquidi newtoniani, per i liquidi pseudoplastici la relazione è non lineare

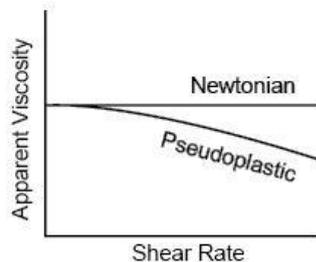


Figura 5.10: Per i liquidi pseudoplastici la viscosità apparente (rapporto tra sforzo di taglio e velocità di deformazione) diminuisce all'aumentare della velocità di deformazione

In particolare, all'aumentare del peso molecolare unitamente ad un basso grado di sostituzione le catene di CMC tendono, per la notevole quantità di interazioni, ad assumere una struttura tridimensionale e manifestare comportamento tissotropico. Tale fenomeno è caratterizzato dall'aumento della viscosità apparente di una soluzione quando essa è lasciata in quiete per un lungo periodo di tempo in seguito a sollecitazione: in tale situazione la soluzione può passare dallo stato liquido a quello di gel. Nel momento in cui, successivamente, alla soluzione tissotropica viene applicata

una sollecitazione di intensità sufficiente, si assiste ad una riduzione della viscosità e nuovamente al passaggio allo stato liquido (Figura 5.5).

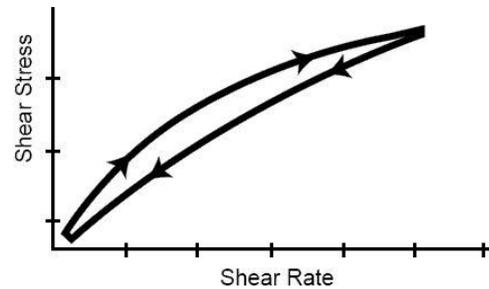


Figura 11.5: Reogramma di un sistema tissotropico: l'andamento dello sforzo di taglio rispetto alla velocità di deformazione è rappresentato da un ciclo d'isteresi

Il campo di applicazione della CMC è piuttosto vasto e spazia dall'uso industriale all'alimentazione, sino all'utilizzo in campo farmaceutico: test dermatologici e tossicologici, infatti, ne hanno garantito la non tossicità, riconosciuta anche dalla FDA [Hercules Inc., 1999].

Grazie alle caratteristiche dimostrate, tra le quali biocompatibilità, stabilità, pseudoplasticità, basso livello di degradazione, reperibilità e capacità di assorbimento d'acqua, la CMC è stata scelta come il polisaccaride più adatto a costituire il nuovo dispositivo. Al fine di renderla più simile all'Acido Ialuronico, dovendone riprodurre il comportamento, l'approccio successivo è stato individuare e definire un processo di modifica chimica per sostituire, in modo controllato, alcuni gruppi carbossimetilici della CMC in ammidi, i gruppi funzionali che caratterizzano l'HA, ottenendo, quindi, la carbossimetilcellulosa ammidata (CMCA).

Capitolo 6

Processo di sintesi dell'idrogel di CMCA

Una volta individuata la via sintetica più adatta per la modifica chimica della carbossimetilcellulosa, è stato definito l'intero protocollo di produzione del nuovo biomateriale. Il processo produttivo si articola in una successione di step ben definiti e controllabili (Figura 6.1) che permettono, reticolando catene lineari di CMC, di ottenere un idrogel di carbossimetilcellulosa ammidata, ossia una matrice tridimensionale di natura polisaccaridica, con caratteristiche chimico-fisiche modulabili e in grado di assorbire un grande quantitativo di fluidi.

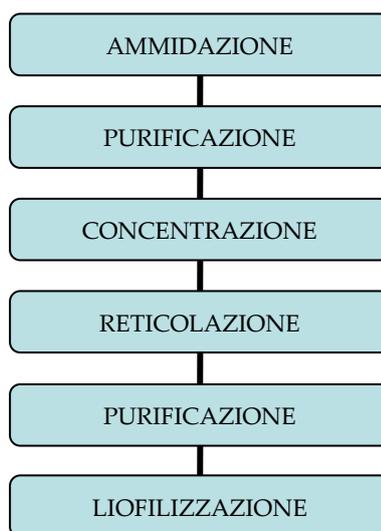


Figura 6.12: Fasi che costituiscono il processo produttivo dell'idrogel di CMCA.

6.1 Ammidazione

La presenza del gruppo carbossilico all'interno della catena di CMC ha permesso di procedere con una via sintetica che prevede la creazione di uno dei legami chimici più stabili in natura, il legame ammidico, che si instaura tra una funzione carbossilica $-\text{COOH}$ e un generico gruppo RNH_2 (funzione amminica).

Le ammidi presentano una struttura rigida e planare e sono composti altamente polari per la delocalizzazione di cariche all'interno della molecola; il dipolo permanente che tale spostamento di elettroni comporta, facilita la formazione di legami ad idrogeno intermolecolari che conferiscono forte stabilità chimica alla struttura.

Nonostante la formazione del legame ammidico sia una reazione fondamentale da un punto di vista chimico e biologico, la sintesi è piuttosto complessa. Infatti, affinché avvenga l'attacco nucleofilo del gruppo amminico al carbossile in condizioni blande, è necessario "attivare" il gruppo carbossilico, sostituendo il gruppo $-\text{OH}$ con un gruppo uscente migliore. Esistono diverse strategie per l'attivazione del gruppo carbossilico che, a seconda del tipo di reagenti utilizzati, richiedono condizioni di reazione differenti. Dopo una rassegna sulle possibili vie sintetiche e sul loro impatto in termini di resa e sicurezza, è stato deciso di abbandonare le reazioni in solvente organico e di perseguire quelle in ambiente acquoso per ridurre drasticamente i rischi derivanti da possibili residui di solvente sul prodotto finito e abbattere il rischio di esposizione a composti tossici per il personale. Tramite le diverse e ripetute prove effettuate per la formazione del legame ammidico, si è scelto di prediligere come miglior via sintetica quella mediante formazione dell'estere attivo, utilizzando come attivatore una soluzione di NHS/EDC, sia per i vantaggi rappresentati dall'utilizzo di soluzioni acquose, sia per rapidità, riproducibilità e resa finale del prodotto che è pari a quasi il 100%.

Particolare attenzione nella fase di ammidazione viene posta nel controllo stechiometrico: il grado di ammidazione (GdA), ossia la percentuale di gruppi carbossilici inizialmente presenti nel polisaccaride trasformati in gruppi metilammidici, può variare dall'1% al 100% del teorico e determina le caratteristiche chimico-fisiche sia del polimero policarbossiammidico di base che dell'idrogel da esso derivato mediante reticolazione.

Per le proprietà richieste al prodotto finale, che verranno descritte nel capitolo successivo, si è deciso di procedere con la produzione di polimero di CMCA con grado di ammidazione del 50%, controllabile mediante l'utilizzo di quantità predefinite di reagenti. La reazione avviene all'interno di un reattore (Figura 6.2) dove il polimero di CMC viene inizialmente solubilizzato in acqua deionizzata e N-idrossisuccinimide (NHS); a esso si aggiunge una soluzione di metilammina (MA) a pH controllato (4,75) e infine la soluzione contenente l' EDC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide).



Figura 6.13: Reattore chimico all'interno del quale avviene la reazione di ammidazione.

La miscela di reazione viene lasciata in agitazione per circa tre ore per consentire la formazione dei legami ammidici (Figura 6.3).

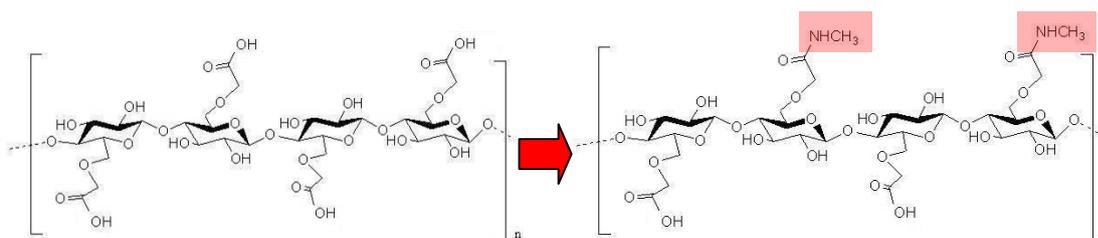


Figura 6.14: rappresentazione mediante formula di struttura della reazione di ammidazione. Sono evidenziati i gruppi metilamidici che sostituiscono i gruppi carbossilici

6.2 Purificazione polimero

La soluzione contenente il polimero di CMCA, ottenuta nella fase di ammidazione, necessita di purificazione per l'eliminazione di eventuali residui di reagenti ancora presenti. Questa operazione è realizzata mediante filtrazione sotto

flusso tangenziale (Tangential Flow Filtration - TFF): si tratta di un metodo per separare molecole dalle dimensioni diverse, utilizzando membrane con un cut-off noto che permetta il passaggio solamente delle molecole a peso molecolare inferiore a quello dei pori delle membrane stesse, utilizzando un'apparecchiatura denominata Cogent M1 (Figura 6.4). Per la CMCA viene utilizzata una membrana con un cut-off di 100KDa che permette di trattenere polimeri dall'alto peso molecolare e di eliminare quindi tutti i sottoprodotti di reazione e i composti che non hanno reagito (Figura 6.5).



Figura 6.4: Cogent M1 per la filtrazione del polimero di CMCA.



Figura 6.5: Particolare della membrana utilizzata per la filtrazione.

La soluzione di polimero di CMCA derivante dalla reazione ha una concentrazione prossima all'1% e presenta una viscosità di circa 700 cPs. Tale valore risulta estremamente limitante per il processo: dalla relazione sotto riportata, che esprime la portata di filtrazione in funzione dei parametri operativi, è evidente come la viscosità giochi un ruolo di notevole importanza in quanto ad essa è direttamente vincolato il flusso di filtrato e quindi l'efficienza del processo:

$$Q = \frac{\pi \Delta p R^4}{8 \eta L}$$

dove

Δp = TMP in TFF = forza motrice del processo

L = spessore della membrana

R = raggio del poro

η = viscosità del prodotto

A tali valori di concentrazione, la viscosità che ne deriva oltre ad avere un effetto diretto sulla portata del filtro, produce poi forti perdite di carico lungo la linea di passaggio del prodotto, con ripercussioni sull'omogeneità di comportamento della membrana lungo tutta la sua superficie e sulle condutture di trasferimento.

Poiché, quindi, la purificazione del prodotto di partenza risulta difficoltosa data la elevata viscosità, è stata richiesta una consulenza alla Millipore SpA per la valutazione della fattibilità di processo e la definizione delle condizioni operative migliori per l'ottimizzazione delle rese. I risultati prodotti da tale studio hanno dimostrato la necessità di effettuare inizialmente una diluizione della soluzione di polimero di almeno 1:10 per abbassarne la viscosità e poter quindi procedere successivamente alla dia-filtrazione a volume costante, al cui termine il polimero viene riportato alla concentrazione iniziale.

La procedura prevede, quindi, di versare 1 litro di CMCA all'interno del serbatoio del Cogent M1 e portare a volume fino a 10 L; mantenendo l'agitazione meccanica viene iniziata la filtrazione con una concentrazione iniziale a 6 L. La fase successiva prevede di riportare la soluzione a 8 L e procedere con una serie di 10 filtrazioni, ognuna delle quali comporta una concentrazione da 8 L a 6 L e richiede quindi la reintegrazione di 2 L d'acqua; terminata la dia-filtrazione la concentrazione prosegue sino al volume finale di 1 L (Figura 6.6). L'aumento di concentrazione richiede una diminuzione della velocità della pompa, per evitare un'eccessiva pressione sulla membrana, il cui valore deve essere continuamente monitorato durante il processo.

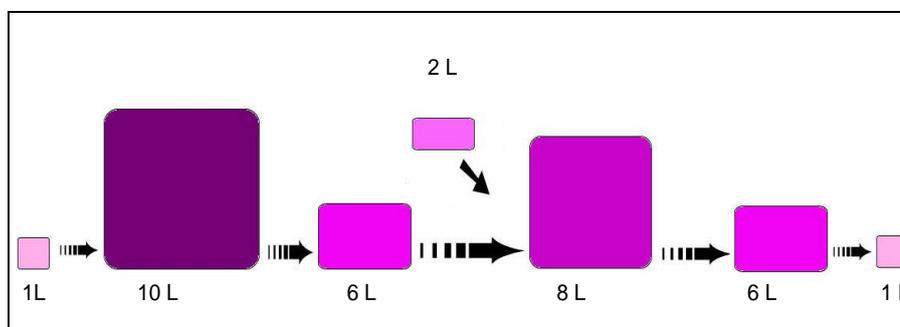


Figura 6.6: Schematizzazione della variazione di volume della soluzione polimerica durante il processo di purificazione

6.3 Concentrazione

Al termine della procedura di purificazione il polimero di CMCA non è realmente concentrato all'1%: si rende necessaria una fase che permetta l'eliminazione di acqua dalla soluzione in quantità definita, tale da garantire il raggiungimento del valore di concentrazione voluto. La fase di concentrazione, quindi, prevede l'evaporazione mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante (Figura 6.7), apparecchiatura utilizzata comunemente per allontanare i solventi da una soluzione di un composto d'interesse, tramite evaporazione a bassa pressione.



Figura 6.7: Evaporatore rotante (Rotavapor) per l'evaporazione a bassa pressione.

Lo strumento è costituito da un pallone di evaporazione contenente la soluzione da evaporare (Figura 6.8), che viene messo in rotazione da un meccanismo motorizzato e immerso in un bagno termostatico per mantenere la soluzione alla temperatura opportuna; vi sono poi un condensatore verticale, o inclinato, che provvede ad abbattere il grosso dei vapori sviluppatasi e un pallone di raccolta che consente il recupero dei solventi condensati. I palloni, il condensatore e gli elementi di raccordo sono realizzati in vetro e tutto il sistema montato deve garantire una perfetta tenuta del vuoto in quanto l'evaporazione viene favorita proprio dall'applicazione, mediante una pompa a membrana, di un'opportuna depressione, che abbassa la temperatura di ebollizione del solvente e consente di limitare la temperatura del bagno termostatico. La velocità di evaporazione viene ulteriormente incrementata dalla rotazione che, creando un velo di soluzione continuamente rinnovata su tutta la parte interna del

pallone, aumenta la superficie della soluzione. I vapori di solvente che vengono a generarsi continuamente si allontanano dal pallone, incontrano la superficie del condensatore opportunamente raffreddata e condensano formando gocce che cadono e vengono raccolte nel pallone di raccolta.



Figura 6.8: Particolare del pallone di evaporazione, all'interno del quale viene immessa la soluzione da concentrare.

La soluzione di CMCA purificata viene immessa nel pallone di evaporazione, che viene fissato al dispositivo di rotazione e di collegamento al condensatore. Il pallone viene immerso nel bagno riscaldante e viene avviata la rotazione. Quindi viene applicato il vuoto al sistema ed inizia l'evaporazione. Al termine delle operazioni si ottiene la separazione del polimero, che rimane nel pallone di evaporazione, dalla quantità di acqua in eccesso, che finisce nel pallone di raccolta.

Il polimero di CMCA così concentrato è quindi pronto per essere utilizzato nelle fasi successive che portano alla produzione dell'idrogel.

6.4 Reticolazione

Un passo ulteriore nello sviluppo del nuovo biomateriale è stato individuare un metodo per creare, a partire dalle catene di CMCA, una struttura tridimensionale con un elevato grado di idratazione, al fine di migliorarne le proprietà chimico-fisiche e meccaniche.

La procedura atta a questo scopo è la reticolazione, o cross-linking: si tratta di una reazione chimica che porta alla formazione di legami chimici tra diverse catene polimeriche, o tra punti differenti della stessa catena, a livello di gruppi funzionali reattivi. Nel caso delle metilammidi, come la CMCA, è possibile ottenere i derivati cross-linkati mediante metodi simili a quelli usati nell'ammidazione primaria, ad

esempio via attivazione dei gruppi carbossilici ancora liberi e reazione con di-ammine. La percentuale dei gruppi carbossilici ancora liberi dopo ammidazione, coinvolti nella reazione di cross-link, viene definita grado di reticolazione (GdR) e il suo valore influisce notevolmente sulle proprietà chimico-fisiche degli idrogel che si ottengono per idratazione delle matrici tridimensionali che i legami formano.

Con una serie di prove si è cercata quale fosse la formulazione più simile all'Acido Ialuronico quanto a GdA e che conferisse migliori caratteristiche di water-uptake e proprietà fisico-reologiche adeguate. Non potendo spingere la reticolazione oltre il 50% essendo la metà dei gruppi carbossilici disponibili già impiegata per la reazione di ammidazione, si è scelto di utilizzare tutti i siti restanti per la creazione di legami chimici trans-catena. Il GdR così ottenuto (50%) dovrebbe garantire valori dei moduli elastici G' (modulo elastico) e G'' (modulo viscoso) adatti alla destinazione d'uso dell'idrogel, consistenza in termini di struttura, senza però inficiare l'iniettabilità del materiale stesso, e un rapporto bilanciato tra viscosità e potere lubrificante.

Come per l'ammidazione, il grado di reticolazione teorico del 50% voluto è ottenibile mediante controllo delle quantità dei reagenti. La procedura prevede la solubilizzazione del polimero di CMCA all'interno del reattore in una soluzione di acqua deionizzata e NHS, alla quale successivamente vengono aggiunte una soluzione a pH controllato contenente diamminopropano (DAP), e una con l'EDC; il tutto lasciato in agitazione per circa tre ore per permettere la formazione dei legami (Figura 6.9).

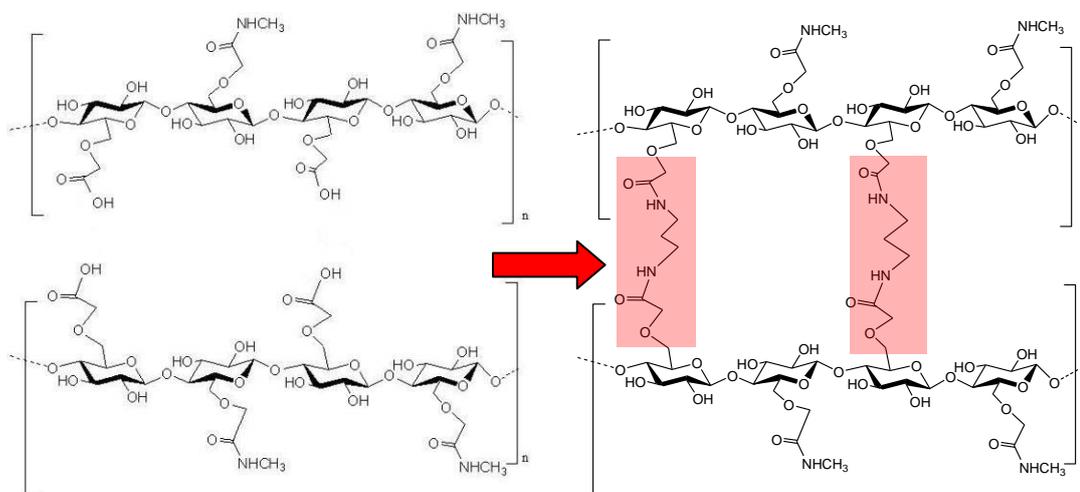


Figura 6.9: Schematizzazione mediante formula di struttura del processo di reticolazione: sono evidenziati i legami che si formano tra le catene di CMCA.

6.5 Purificazione gel

Anche per l'idrogel di CMCA è necessario, in seguito alla reticolazione, effettuare la purificazione per allontanare tutte le impurezze e i sottoprodotti di reazione. Nello specifico la procedura prevede di eseguire quattro lavaggi, per ogni quantitativo di gel considerato, con una soluzione allo 0,75% di NaCl, utilizzando l'apposito filtro. Si procede poi effettuando diversi lavaggi in acqua deionizzata, fino a che l'acqua di lavaggio sia esente da impurezze, il che viene verificato controllando lo spettro UV.

6.6 Liofilizzazione

L'ultima fase del processo consiste nella liofilizzazione, che permette l'eliminazione dell'acqua da una matrice organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della matrice stessa. Caratteristica del prodotto finale è di essere particolarmente predisposto alla solubilizzazione.

Il metodo comprende fondamentalmente due processi fisici: la surgelazione e la sublimazione e prevede l'applicazione del calore al prodotto surgelato mantenuto sottovuoto; l'acqua contenuta nel prodotto e segregata sotto forma di ghiaccio, viene estratta direttamente come vapore per sublimazione, poiché si lavora con valori di pressione molto al di sotto di 6,10 mbar (o 4,58 mmHg) che corrisponde al punto triplo (Pt) dell'acqua, cioè alle condizioni che consentono la contemporanea presenza dell'acqua nelle tre fasi solido-liquido-vapore (Figura 6.10). Il vapore acqueo estratto deve essere catturato per congelamento su serpentine fredde (condensatori); i gas incondensabili vengono aspirati ed eliminati dalla pompa da vuoto. Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del prodotto, così che la matrice originale sia quasi perfettamente ripristinabile quando, al momento dell'utilizzo, si voglia procedere alla reidratazione.

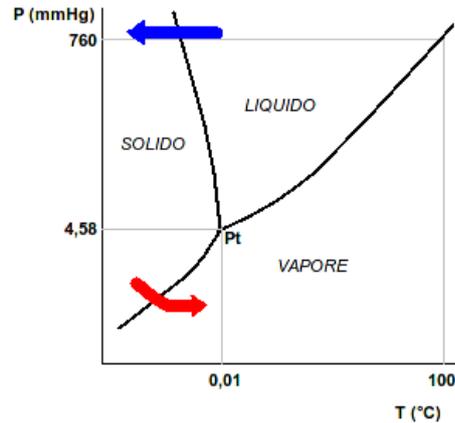


Figura 6.10: Diagramma di fase dell'acqua (P=pressione, T=temperatura). Sono evidenziati i passaggi relativi al congelamento (in blu) e alla sublimazione (in rosso).

In relazione alla quantità, alla natura ed alla geometria del substrato, il processo ha durata variabile. Nel caso di idrogel di CMCA per una quantità indicativa di 50 grammi il processo richiede circa 3 settimane. Una volta concluso, la "rottura" del vuoto si fa spesso con un gas inerte (p. es. azoto) che, andando a permeare la superficie porosa del prodotto, lo protegge dall'ossidazione.

Terminato il processo di liofilizzazione, l'idrogel disidratato di CMCA (Figura 6.11) è quindi pronto per poter essere sottoposto alle analisi chimiche descritte nel capitolo successivo.



Figura 6.11: idrogel di CMCA liofilizzato.

Capitolo 7

Caratterizzazione dell'idrogel di CMCA

Parallelamente alla definizione del processo produttivo, il progetto di ricerca si è indirizzato anche alla caratterizzazione del nuovo biomateriale. Una serie di analisi chimiche, fisiche e meccaniche sono state condotte su materie prime, prodotti intermedi e prodotto finale, al fine di determinare in quale modo le fasi di produzione influiscano sulle specifiche dell'idrogel.

7.1 Spettroscopia Infrarossa

La spettroscopia infrarossa permette di caratterizzare chimicamente i gruppi e la struttura di un composto chimico. La radiazione elettromagnetica infrarossa, che si estende da 12900 cm^{-1} (700 nm) a 10 cm^{-1} (1000 nm), viene assorbita e convertita da una molecola organica in energia di vibrazione molecolare. La frequenza, o lunghezza d'onda, di assorbimento dipende dalle masse relative degli atomi, dalle costanti di forza dei legami, e dalla geometria degli atomi. Le energie associate a radiazioni IR, interagendo con le energie di legame, possono generare due tipi di vibrazione: lo *stretching* (stiramento), che porta all'allungamento e all'accorciamento della distanza tra due atomi lungo l'asse dei legami, e il *bending* (piegamento) che comporta una variazione degli angoli di legame (Figura 7.1).

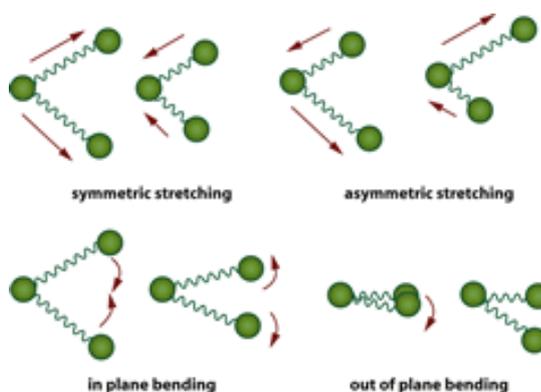


Figura 7.15: esemplificazione delle vibrazioni atomiche generate dall'assorbimento di radiazioni: *stretching* (stiramento) simmetrico e asimmetrico, ossia variazione della distanza tra gli atomi lungo l'asse di legame (in alto); *bending* (piegamento) sul piano e fuori dal piano, ossia variazione degli angoli di legame (in basso).

La relazione tra frequenza di oscillazione, masse atomiche e costante di forza dei legami è stabilita dalla seguente equazione che deriva dalla Legge di Hooke, secondo la quale due atomi legati fra loro possono essere considerati come un semplice oscillatore armonico, rappresentato da due masse legate da una molla.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{f}{(M_x M_y)/(M_x + M_y)}}$$

dove

$\bar{\nu}$ = frequenza vibrazionale (cm^{-1})

c = velocità della luce (cm/s)

f = costante di forza del legame (dyne/cm)

M_x e M_y = massa (g) dell'atomo x e dell'atomo y rispettivamente

Dalla relazione precedente si evince che le vibrazioni in cui sono coinvolti atomi più pesanti assorbono a frequenze più basse, mentre quelle che coinvolgono i legami più forti assorbono a frequenze più alte; individuando le frequenze a cui cadono determinate bande di assorbimento è quindi possibile identificare il gruppo funzionale associato a ciascuna banda per confronto con valori tabulati. Con questa tecnica vengono raccolte informazioni anche sul tipo di legami intramolecolari e sulle interazioni tra gruppi funzionali del composto.

L'acquisizione degli spettri IR avviene tramite una strumentazione munita dell'interferometro di Michelson, dispositivo ottico multiplo che permette l'analisi contemporanea e in continuo di tutte le energie trasmesse, riducendo notevolmente il tempo di registrazione. L'interferometro trasforma la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un interferogramma, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza ma del tempo. Mediante Trasformata di Fourier, poi, l'interferogramma viene trasformato dal calcolatore in uno spettro che rappresenta la variazione dell'intensità del segnale in funzione della lunghezza d'onda della radiazione. Gli spettri IR sono stati registrati mediante uno spettrometro IR (PerkinElmer Spectrum 400) (Figura 7.2).



Figura 7.16: Spettrometro IR PerkinElmer Spectrum 400.

Dal confronto tra gli spettri dei polimeri nativi con i polimeri modificati e con quelli reticolati, si può avere una prova sperimentale dell'avvenuta modifica o reticolazione. La Tabella 7.1 consente l'interpretazione dei picchi di assorbimento dei legami costituenti la CMC e la CMCA.

Tabella 7.1: Interpretazione delle bande di assorbimento significative relativamente ai legami presenti nella CMC e nella CMCA.

Interpretazione delle bande significative	
1410 cm^{-1}	<i>Stretching vibrazionale COO⁻</i>
1590 cm^{-1}	<i>Stretching vibrazionale C=O</i>
1650 cm^{-1}	<i>Stretching vibrazionale C=N</i>

Viene riportato in Figura 7.3 lo spettro del polimero CMC nativo che mostra, come previsto, i picchi più significativi a 1593 e 1413 cm^{-1} , confermando la presenza dei legami COO^- e $\text{C}=\text{O}$.

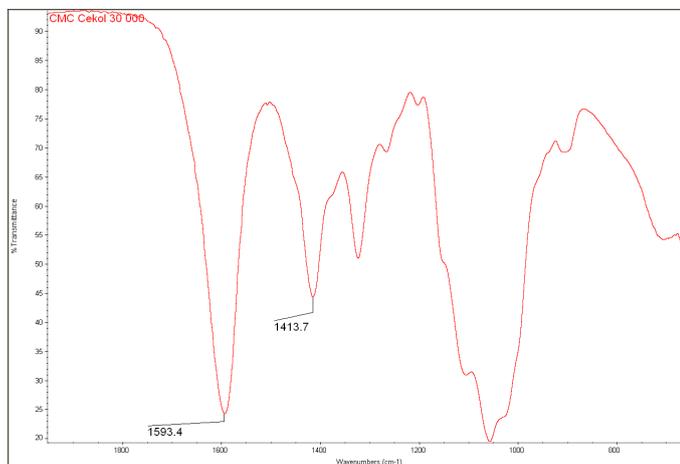


Figura 7.3: Spettro del polimero nativo di CMC. I picchi di assorbimento indicano la presenza dei gruppi COO^- e $\text{C}=\text{O}$.

La presenza nello spettro relativo all'analisi del polimero di CMCA (Figura 7.4), del picco dell'ammide a lunghezza d'onda 1653.8 cm^{-1} conferma l'avvenuta modifica all'interno della struttura polisaccaridica.

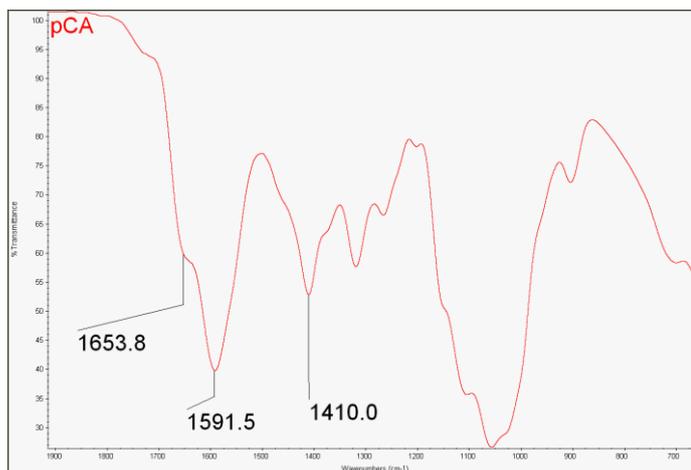


Figura 7.4: Spettro del polimero di CMCA. La presenza del picco a circa 1650 cm^{-1} corrispondente al legame $\text{C}=\text{N}$ conferma l'avvenuta ammidazione.

Nello spettro del gel di CMCA (Figura 7.5), infine, è possibile confermare la presenza del picco a 1650 cm^{-1} che risulta avere una percentuale maggiore rispetto al picco presente nel polimero di CMCA.

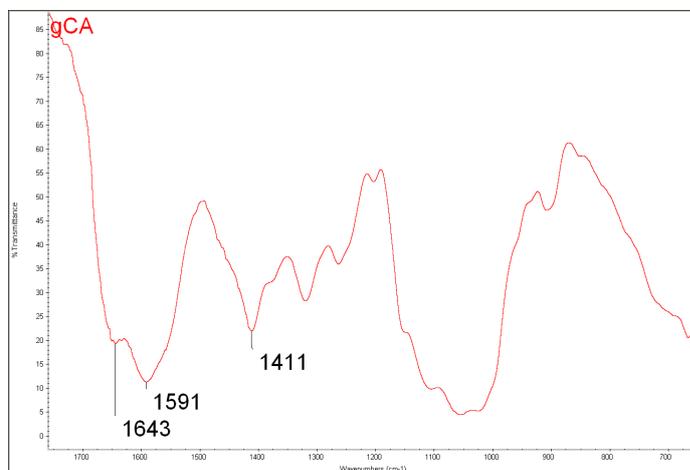


Figura 7.5: Spettro del gel di CMCA: il picco di assorbimento relativo al legame ammidico (1643 cm^{-1}) è presente e in percentuale maggiore rispetto al polimero di CMCA.

7.2 Spettrofotometria UV

La spettrofotometria UV-Visibile si basa sull'assorbimento selettivo, da parte di molecole, delle radiazioni con $\lambda=10\div780\text{ nm}$, che danno luogo a variazioni di energia elettronica. L'utilizzo di raggi monocromatici, infatti, consente un'analisi di tipo quantitativo, in quanto l'assorbimento di una radiazione che attraversa una soluzione dipende dalla concentrazione della soluzione stessa: la misura dell'assorbimento permette la determinazione della concentrazione.

Se si fa passare attraverso una soluzione a concentrazione incognita una radiazione monocromatica (cioè di una determinata λ) di intensità I_0 , al di là della soluzione si trova una radiazione di intensità I , uguale o minore ad I_0 , dipendentemente dall'assorbimento verificatosi. La frazione di luce trasmessa, rispetto a quella incidente, viene definita Trasmittanza (T), data da:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

La trasmittanza esprime la frazione della luce incidente che ha attraversato il campione senza essere assorbita: tuttavia più comunemente si fa riferimento all'entità della

radiazione assorbita, detta Assorbanza (A), pari al logaritmo del reciproco della trasmittanza:

$$A = \log \frac{1}{T}$$

L'assorbanza risulta proporzionale alla concentrazione del campione secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

dove:

A = assorbanza del campione

ε = coefficiente di estinzione molare, specifico per ogni sostanza

c = concentrazione (mol/l)

d = cammino ottico (cm)

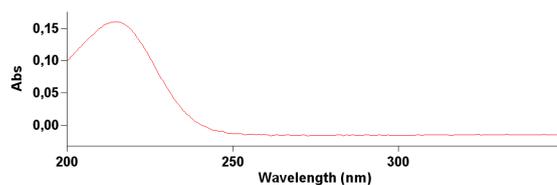
L'analisi allo Spettrofotometro UV (Figura 7.6) permette di evidenziare se durante il processo di purificazione del polimero, nelle acque di lavaggio siano presenti bande significative, riconducibili a probabili impurezze o a reagenti che non hanno preso parte alla sintesi.



Figura 7.6: Spettrofotometro Cary 50, Varian.

A titolo di esempio si riportano le lunghezze d'onda di assorbimento dei reagenti utilizzati nel processo di sintesi, con le relative analisi effettuate con lo Spettrofotometro UV (Figure 7.7, 7.8 e 7.9).

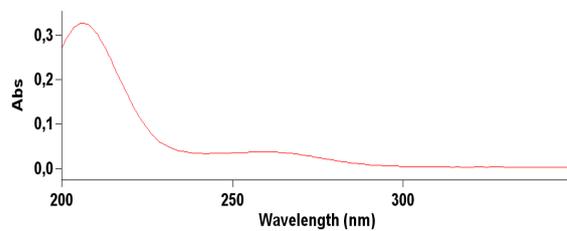
EDC $\lambda = 214 \text{ nm}$



Scan Analysis Report	
Sample Name: EDC	
Peak Table	
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0,0100
Range	350,0nm to 199,9nm
Wavelength (nm)	Abs
214,5	0,160

Figura 7.7: Spettro di assorbimento e risultato spettrofotometria UV di EDC.

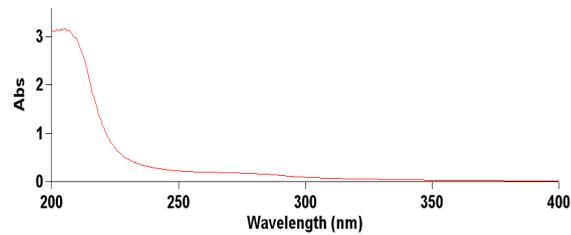
NHS $\lambda = 206 \text{ nm}$



Scan Analysis Report	
Sample Name: NHS	
Peak Table	
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0,0100
Range	350,0nm to 199,9nm
Wavelength (nm)	Abs
206,0	0,327

Figura 7.8: Spettro di assorbimento e risultato spettrofotometria UV di NHS.

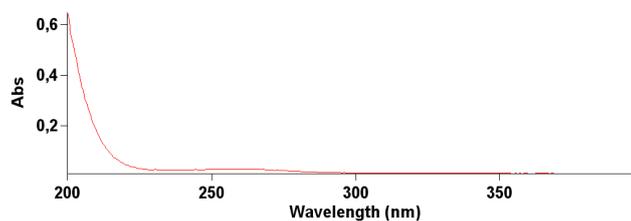
CMC

 $\lambda = 205 \text{ nm}$ 

Scan Analysis Report	
<u>Sample Name: pC</u>	
Peak Table	Peaks
Peak Style	0,0100
Peak Threshold	800,0nm to 200,0nm
Range	
Wavelength (nm)	Abs
205,0	3,163

Figura 7.9: Spettro di assorbimento e risultato spettrofotometria UV di CMC.

L'analisi delle impurezze sul polimero permette di determinare quando la purificazione dello stesso possa ritenersi conclusa, ovvero solo quando non siano presenti assorbimenti significativi (A minori di 0,1) nella regione dello spettro analizzata. Le diverse prove effettuate hanno dimostrato che il numero minimo di lavaggi è nove: lo spettro di assorbimento UV di un campione di acqua di diafiltrazione di polimero di CMCA dopo nove lavaggi con acqua deionizzata, infatti, nell'intervallo della banda dello spettro analizzata, non presenta assorbimenti da parte di impurezze rilasciate dal polimero (Figura 7.10).



Scan Analysis Report	
<u>Sample Name: acqua purificazione lavaggio 9 del campione pCA11</u>	
Peak Table	Peaks
Peak Style	0,0100
Peak Threshold	400,0nm to 199,9nm
Range	
<i>No peak found above threshold</i>	

Figura 7.10: Spettro di assorbimento e risultato spettrofotometria UV di CMCA dopo 9 lavaggi.

7.3 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica largamente sfruttata per la valutazione della morfologia superficiale dei campioni. La combinazione di alti ingrandimenti, alta risoluzione, elevata profondità di campo, facile preparazione e osservazione del campione, rende il SEM uno degli strumenti più affidabili e più semplici da utilizzare per lo studio e la diagnostica delle difettosità nei componenti elettronici.

Al fine di valutare l'effetto dell'ammidazione sulla struttura dei gel, oltre all'idrogel di CMCA sono stati realizzati dei gel di CMC non ammidati con lo stesso grado di reticolazione (50%) ed è stata condotta la caratterizzazione tramite SEM su alcuni campioni di entrambe le formulazioni per consentirne un'analisi comparativa riguardo la morfologia. In Figura 7.11 si riportano, a titolo di esempio, un campione di gel di CMC e uno di CMCA.

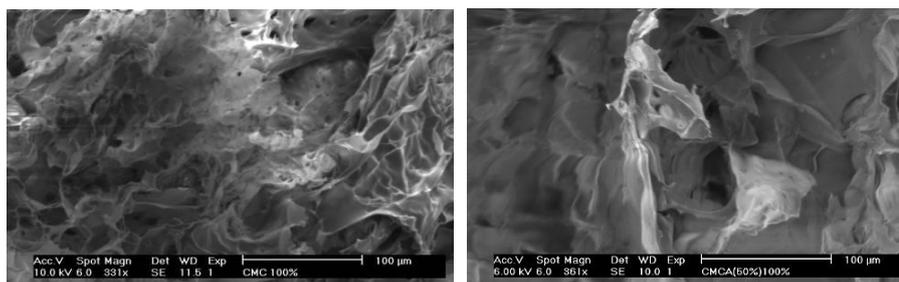


Figura 7.11: Immagini ottenute tramite SEM di un campione di gel di CMC (a sinistra) e di un gel di CMCA (a destra).

Dall'analisi condotta si è osservato che gli idrogel ammidati presentano una morfologia molto più aperta, caratterizzata da lamine distese e meno compatte rispetto ai gel ottenuti a partire dai polisaccaridi non modificati. La struttura estremamente "aperta" e frastagliata degli idrogel ammidati si ripercuote su una proprietà fondamentale di questa classe di materiali: la capacità di rigonfiare assorbendo acqua, come verrà trattato nel paragrafo successivo.

7.4 Rigonfiamento

Peculiarità degli idrogel è di possedere la capacità di rigonfiarsi mantenendo la propria struttura tridimensionale. Ne consegue, quindi, che il componente principale e fondamentale dell'idrogel è l'acqua, classificata in base alla posizione che assume all'interno della struttura. Quando un idrogel allo stato secco assorbe dell'acqua, le prime molecole che entrano nella matrice idratano i gruppi polari; si parla, in tal caso, di "acqua primaria legata". Non appena i gruppi polari risultano idratati, il network rigonfia ed espone i gruppi idrofobici, i quali vanno ad interagire, comunque, con le molecole di acqua; si tratta, quindi, di "acqua idrofobicamente legata" o, equivalentemente, di "acqua secondaria legata". Dopo che i siti polari e quelli idrofobici hanno interagito con le molecole d'acqua, il network assorbe un'ulteriore quantità d'acqua, dovuta alla pressione osmotica, che rappresenta la forza spingente delle catene polimeriche verso una diluizione infinita. Questo *swelling* aggiuntivo è contrastato dai legami della matrice, i quali danno origine alla forza elastica di richiamo del network; il rigonfiamento raggiunge, così, un livello di equilibrio. L'acqua assorbita dopo che i gruppi ionici, polari ed idrofobici sono stati saturati, responsabile del rigonfiamento aggiuntivo, è denominata "acqua libera" o "acqua di struttura" e va a riempire lo spazio tra le catene del network e/o il centro di macropori e di vuoti.

La struttura della matrice che costituisce l'idrogel influisce notevolmente sull'idrofilicità del materiale, in particolare le modifiche chimiche determinano notevoli variazioni nel comportamento in acqua del gel. A tal proposito è stata eseguita una prova in cui si è valutato il rapporto tra il peso del gel secco ed il peso dell'acqua legata per un normale gel di CMC e per quello di un gel di CMC ammidato. Il risultato, come indicato nel grafico di Figura 7.12, ha dimostrato che il processo di ammidazione consente di conferire alla CMCA una maggiore capacità di rigonfiarsi e di trattenere acqua rispetto al polimero di base (CMC 100%).

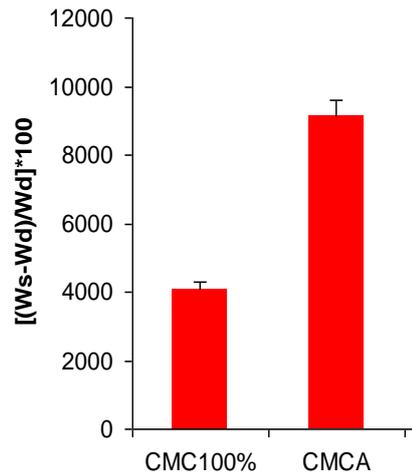


Figura 7.12: Istogramma che illustra il grado di rigonfiamento per il gel di CMC e per il gel di CMCA: è evidente come l'ammidazione migliori la capacità di rigonfiarsi del polimero.

7.5 Caratterizzazione meccanica

Si è visto precedentemente come le prestazioni delle articolazioni siano strettamente connesse con le proprietà viscoelastiche del liquido sinoviale, in particolare l'elevata viscosità del fluido garantisce sia la lubrificazione che la funzione di *shock absorber* del sistema articolare. Una delle specifiche richieste all'idrogel di CMCA, considerata l'applicabilità in cavità articolare, è quindi un elevato valore di viscosità, paragonabile a quello del liquido sinoviale di un'articolazione sana. Si sono quindi rese necessarie delle prove viscosimetriche e reologiche al fine di valutare come le varie modificazioni strutturali del polimero di partenza influiscano sulla viscosità del materiale.

La viscosimetria riguarda prevalentemente le misure reologiche nei liquidi, compresi quelli viscoelastici. I liquidi si distinguono principalmente in newtoniani (la cui viscosità non dipende dalla velocità di deformazione) e che sono in genere liquidi a basso peso molecolare, e non-newtoniani (la cui viscosità varia con la velocità di deformazione). Il polimero di CMCA ricade nella classe dei non-newtoniani e manifesta caratteristiche pseudoplastiche, ovvero una viscosità che diminuisce all'aumentare della velocità di deformazione. Le prime prove sono state condotte su soluzioni all'1% del polimero di CMC e CMCA mediante viscosimetro vibrazionale Bioclass SV-10 A&D. Nonostante questo tipo di viscosimetro, solitamente utilizzato per fluidi newtoniani, sia poco adatto alla caratterizzazione di un polimero viscoelastico e pseudoplastico per la variabilità della viscosità con la velocità di deformazione, riesce comunque a dare un riferimento della viscosità dei polimeri trattati fornendo valori di

viscosità corrispondenti a velocità di deformazione dell'ordine di 10^2 s^{-1} . La Figura 7.13 mostra il meccanismo di base del viscosimetro vibrazionale.

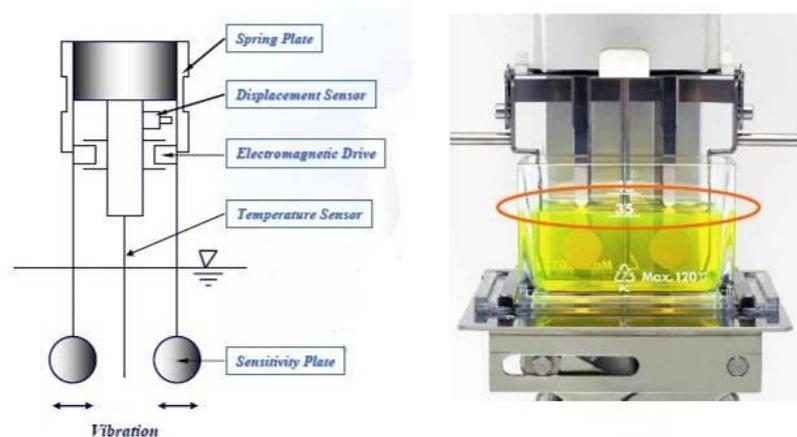


Figura 7.13: Schema di funzionamento e foto di un viscosimetro vibrazionale Bioclass SV-10 A&D.

Quando le piastre sono poste in vibrazione con una frequenza costante, l'ampiezza dell'oscillazione varia a seconda del livello di attrito viscoso prodotto dal campione. Per rendere l'ampiezza uniforme, il viscosimetro gestisce e controlla una corrente elettrica usata per mettere in movimento il sistema. Essendo la forza di attrito direttamente proporzionale alla viscosità, anche la corrente elettrica che fa vibrare le piastre con frequenza costante ed ampiezza uniforme risulta direttamente proporzionale alla viscosità del campione. Lo strumento misura la corrente elettrica utilizzata per azionare il dispositivo e converte il risultato in un valore di viscosità.

Il polimero di CMC mostra i seguenti valori di viscosità (Figura 7.14):

$$\eta = 130 \text{ mPas} \pm 0,7 \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

$$\eta = 116 \text{ mPas} \pm 0,6 \text{ a } 37^\circ\text{C}$$

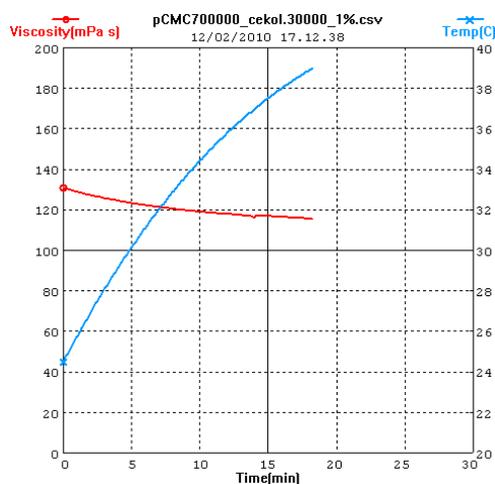


Figura 7.14: Grafico che illustra l'andamento della viscosità e della temperatura in funzione del tempo per un campione di polimero di CMC

Il polimero di CMCA in concentrazione all'1% in acqua mostra i seguenti valori di viscosità (Figura 7.15):

$$\eta = 61,7 \text{ mPas} \pm 0,9 \text{ a } 25^{\circ}\text{C}$$

$$\eta = 47,1 \text{ mPas} \pm 0,6 \text{ a } 37^{\circ}\text{C}$$

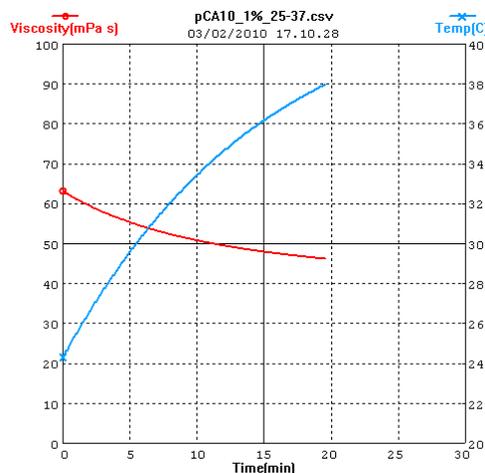


Figura 7.15: Grafico che illustra l'andamento della viscosità e della temperatura in funzione del tempo per un campione di polimero di CMCA.

I dati evidenziano come la modifica chimica in ammidi dei gruppi COO comporti un sensibile decremento dei valori di viscosità delle soluzioni polimeriche.

La caratterizzazione tramite il viscosimetro vibrazionale risulta più adatta per soluzioni polimeriche rispetto ai gel, in quanto l'immersione dell'asta dello strumento non inficia la struttura del materiale e di conseguenza la misura rilevata. Da prove effettuate sull'idrogel di CMCA con un viscosimetro vibrazionale, infatti, si è potuto appurare la non idoneità della prova per la caratterizzazione dello stesso, palesata da bruschi salti dei valori di viscosità con piccole variazioni di temperatura e tempo. Probabilmente, essendo l'idrogel molto reticolato, l'immersione delle sonde per la misura tende a frammentarlo e durante la vibrazione la lettura è falsata in quanto vengono rilevati valori molto variabili di viscosità dovuti alle disomogeneità del campione e soprattutto alla variabilità della corrente utilizzata dallo strumento per tenere in movimento le aste con frequenze e ampiezze delle oscillazioni costanti. Allo stesso modo risulta non idoneo il viscosimetro rotazionale (Figura 7.16) nel quale un rotore cilindrico e motorizzato viene immerso nel campione e fatto ruotare ad una velocità costante.

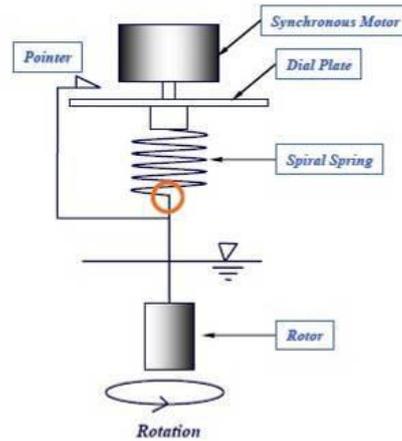


Figura 7.16: Schema di funzionamento di un viscosimetro rotazionale.

Questo strumento calcola la viscosità assumendo che sia direttamente proporzionale alla coppia necessaria per tenere in rotazione il rotore con una velocità costante e quindi all'angolo di torsione della molla, il cui indice è indicato sulla scala. Nel caso dell'idrogel, l'immersione dell'asta tende a frammentare il materiale e il movimento della stessa tende inoltre ad allontanarlo falsando la misura.

Si è dunque verificata l'esigenza di una caratterizzazione reologica dell'idrogel di CMCA eseguita tramite un reometro rotazionale che permette di effettuare misure di viscosità in regime stazionario, modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') in regime oscillatorio e rilassamento in funzione di stress o velocità. Le prove sono state effettuate tramite un reometro rotazionale a stress controllato Haake RS150, geometria a piatti paralleli zigrinati (35 mm), e condotte ad una temperatura $T = 25 \pm 0,1$ °C. Sono stati effettuati sia test in regime oscillatorio (*stress sweep*, *frequency sweep*) che prove in continuo (*stress ramp*, *creep test*):

- *stress sweep*: G' e G'' sono determinati come funzione dello sforzo applicato a frequenza e temperatura costante; questo tipo di prova consente di determinare la regione di viscoelasticità lineare esibita dal materiale (la zona in cui i due moduli si mantengono approssimativamente costanti);
- *frequency sweep*, in cui G' e G'' sono determinati come funzione della frequenza, a temperatura e sforzo fissati. Con questa prova si ottiene uno spettro meccanico che evidenzia le proprietà viscoelastiche e permette di distinguere la

morfologia del materiale indagato, consentendo anche di capire se si tratta di soluzione diluita, soluzione concentrata, gel debole o un gel forte;

- *stress ramp test*: classico metodo per valutare lo *yield stress*, ovvero quel valore di sforzo sotto il quale il materiale comincia a fluire diminuendo la propria viscosità;
- *creep test*: il campione è sottoposto ad uno stress quasi istantaneo e costante e viene misurata la deformazione in funzione del tempo. Una volta rimosso il carico, si valuta se il sistema ritorna o meno e a quale velocità nella sua condizione originale.

Con la prova *stress sweep* è stata individuata una regione di viscoelasticità lineare che va da 0 a qualche decina di Pa; ciò vuol dire che per una caratterizzazione reologica corretta non si possono adottare valori di sforzo di taglio che cadano al di fuori di questa zona. Il test è stato effettuato sia sul campione nativo che sullo stesso dopo agitazione: la prova non ha palesato sensibili differenze (Figura 7.17).

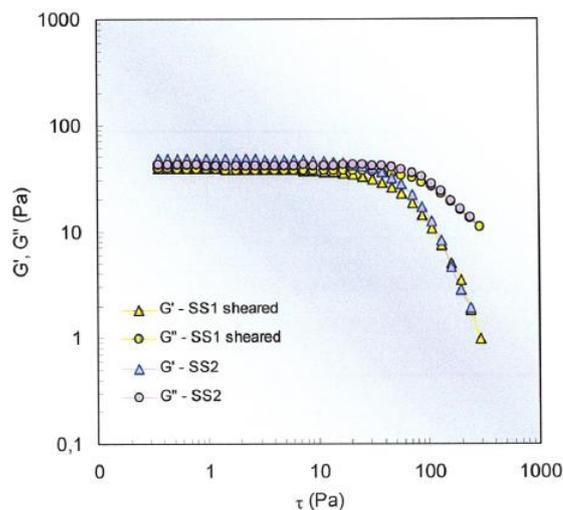


Figura 7.17: Valori dei moduli G' e G'' in funzione dello sforzo ottenuti da prove sul campione tal quale e dopo shear.

Il *frequency sweep* ha confermato l'andamento tipico di gel per il polimero reticolato, mostrando un incremento dei moduli elastici al crescere della frequenza. La prova è stata effettuata sia prima che dopo agitazione. Nel primo caso G' è sempre predominante rispetto a G'' ; ovvero è sempre predominante la caratteristica elastica del

materiale, anche se di poco, rispetto a quella viscosa; nel secondo caso, si parte invece da una condizione in cui G'' risulta maggiore di G' , e si arriva in un punto (frequenza di *cross over*) in cui le rette dei due moduli si intersecano e ritorna predominante la componente elastica. Quest'ultimo caso è quello che maggiormente si avvicina al comportamento del liquido sinoviale fisiologico (Figura 7.18).

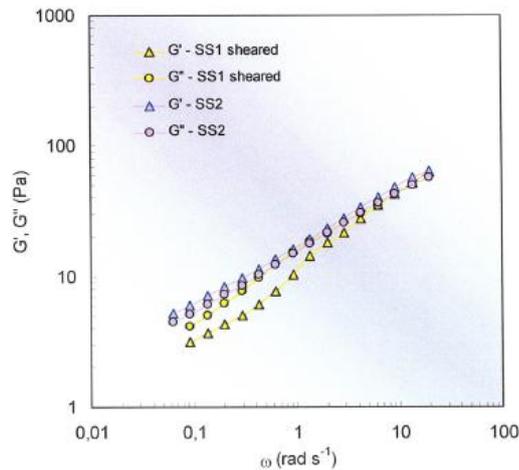


Figura 7.18: spettri meccanici dell'idrogel di CMCA tal quale e dopo shear.

Si è inoltre monitorato l'andamento della viscosità all'aumentare dello sforzo di taglio applicato, ed è stata confermata la caratteristica pseudo-plastica dell'idrogel: la viscosità, infatti, diminuisce all'aumentare dello sforzo di taglio applicato (Figure 7.19 e 7.20).

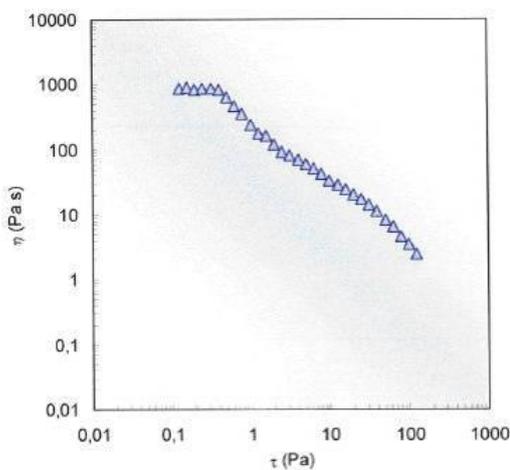


Figura 7.19: viscosità in funzione dello sforzo.

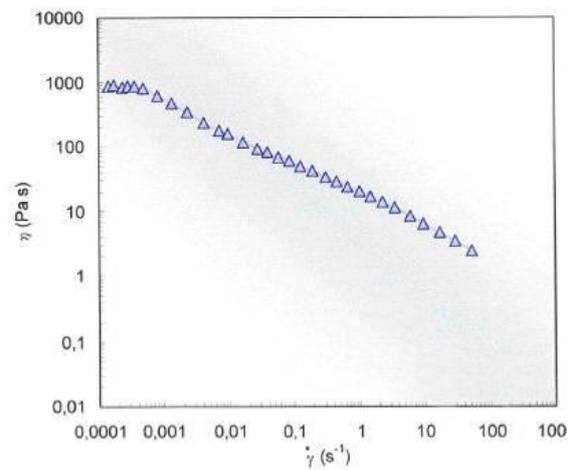


Figura 7.20: viscosità in funzione della velocità.

Le prove di creep test, infine, nelle quali è stata misurata la deformazione in funzione del tempo di un campione sottoposto ad uno stress quasi istantaneo e costante, hanno confermato che l'idrogel di CMCA sostiene i carichi applicati senza danneggiarsi, e ritorna nella conformazione originale una volta scaricato dall'azione degli stessi (Figura 7.21).

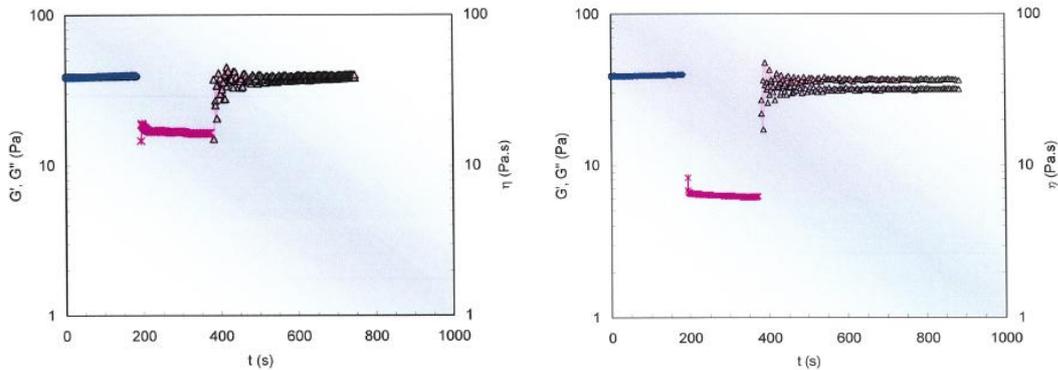


Figura 7.21: andamento della deformazione in funzione del tempo di un campione sottoposto a stress quasi istantaneo per velocità di deformazione differenti (1 s^{-1} a sinistra e 10 s^{-1} a destra). L'idrogel di CMCA ritorna nella conformazione iniziale una volta rimosso il carico.

Un altro aspetto da tenere in considerazione è la lubrificazione che l'idrogel di CMCA deve garantire al fine di ridurre il rischio che la cartilagine si deteriori per usura. Scopo della lubrificazione, infatti, è diminuire l'attrito fra due elementi solidi in moto relativo sottoposti a carico. Il sistema più efficace in tal senso è quello in cui le superfici di carico risultano completamente separate da un sottile strato di fluido per cui la resistenza al rotolamento o allo scorrimento, rapportata al carico, è molto bassa. Esistono diversi modelli di lubrificazione che principalmente si suddividono in due tipologie (Figura 7.22) [Wright e Dowson, 1976]:

- lubrificazione di strato limite (*boundary lubrication*): la lubrificazione è determinata dall'interazione delle superfici tra loro molto vicine o in alcuni punti proprio a contatto per la presenza di uno strato fluido interposto di spessore molto ridotto;
- lubrificazione da film fluido (*fluid film lubrication*): l'azione lubrificante è espletata da uno strato di fluido interposto tra le superfici che mantiene la separazione delle stesse. Quest'ultimo tipo di lubrificazione si differenzia in:

- lubrificazione idrodinamica (*hydrodynamic lubrication*): il rapido movimento relativo delle superfici fa convergere il fluido tra le superfici e la pressione che viene così a crearsi mantiene la separazione;
- lubrificazione elastoidrodinamica (*elastohydrodynamic lubrication*): quando il materiale caricato è morbido, esso si deforma sotto l'azione della pressione idrodinamica e il fluido viscoelastico che si interpone tra le superfici aumentando la viscosità e acquistando stabilità permette la lubrificazione;
- *squeeze-film*: quando due superfici in avvicinamento intrappolano il lubrificante tra esse, la viscosità del fluido determina la sua resistenza alla fuoriuscita dalla zona di contatto e si crea quindi un effetto cuscinetto che mantiene la separazione delle superfici;
- lubrificazione idrostatica (*hydrostatic lubrication*): l'iniezione dall'esterno del fluido tra le superfici genera una pressione tale da permettere la lubrificazione.

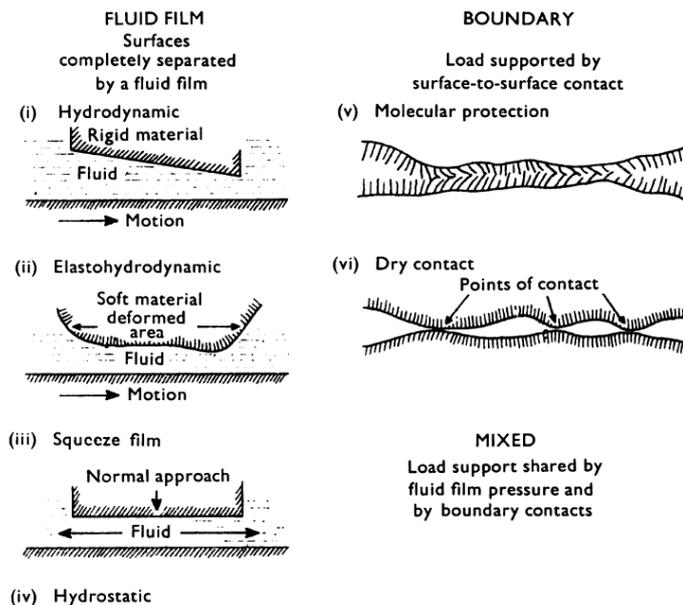


Figura 7.22: Schematizzazione dei modelli di lubrificazione.

La meccanica della lubrificazione nelle articolazioni sinoviali è particolarmente complessa e nessuna delle tipologie precedenti, presa singolarmente, permette un'adeguata e completa descrizione del meccanismo. Si pensa, in linea di principio, che la lubrificazione articolare dipenda dall'esistenza di un fluido tissotropico ed elastico tra le superfici articolari, che l'area del film di carico dipenda dall'elasticità della

cartilagine e che il gradiente di velocità presente tra le superfici articolari dipenda anche dalla deformazione laterale delle superfici stesse. Il fluido sinoviale ha proprietà tissotropiche ed elastiche e la sua viscosità diminuisce all'aumentare della velocità di spostamento ma resiste a pressioni istantanee; per sue proprietà viscoelastiche e la sua affinità alle superfici cartilaginee, non può essere spinto fuori dallo spazio interposto tra le due superfici di carico. Se tuttavia il fluido sinoviale subisce qualche cambiamento e acquista caratteristiche newtoniane, esso allora può essere spinto fuori e non è più in grado di sopportare un carico costante a tutte le velocità di spostamento. Tali cambiamenti nel fluido sinoviale comportano, quindi, un danno alle superfici articolari poiché l'elasticità della cartilagine non è sufficiente a prevenire l'aumento della frizione. Tuttavia il fluido sinoviale di per sé non è sufficiente a mantenere una lubrificazione efficiente: la capacità di recupero e l'elasticità tempo-dipendente e stress-dipendente della cartilagine gioca un ruolo importante; la degenerazione della cartilagine, infatti, comporta la degradazione chimico-meccanica del fluido sinoviale. La lubrificazione nelle articolazioni, quindi, è legata all'interdipendenza tra fluido sinoviale, cartilagine e superfici articolari e al modo in cui queste interagiscono sotto le diverse condizioni di carico [Dintenfass, 1963].

Data la complessità della struttura si ipotizza quindi che più tipi di lubrificazione agiscano nelle articolazioni sinoviali umane a seconda delle varie condizioni cui sono esse sottoposte. Con riferimento, ad esempio, all'articolazione del ginocchio durante il ciclo del passo è possibile individuare, come evidenziato dalla Figura 7.23, la successione di quattro fasi in cui la distribuzione del carico sulle superfici articolari è differente e di conseguenza risulta differente il tipo di lubrificazione che si esplica. L'appoggio calcaneare comporta la generazione di una fase di *squeeze film* per la formazione di una pellicola di liquido dovuta allo schiacciamento delle due superfici; lo spostamento del carico dal tallone alla punta delle dita e la flessione del ginocchio nella prosecuzione del passo portano alla generazione di una lubrificazione elastoidrodinamica, seguita da una nuova fase di *squeeze film* e lubrificazione di strato limite nel caso di un limitato spessore di fluido; durante l'ultima fase della camminata, corrispondente all'oscillazione, si ripresenta una lubrificazione di tipo elastoidrodinamico.

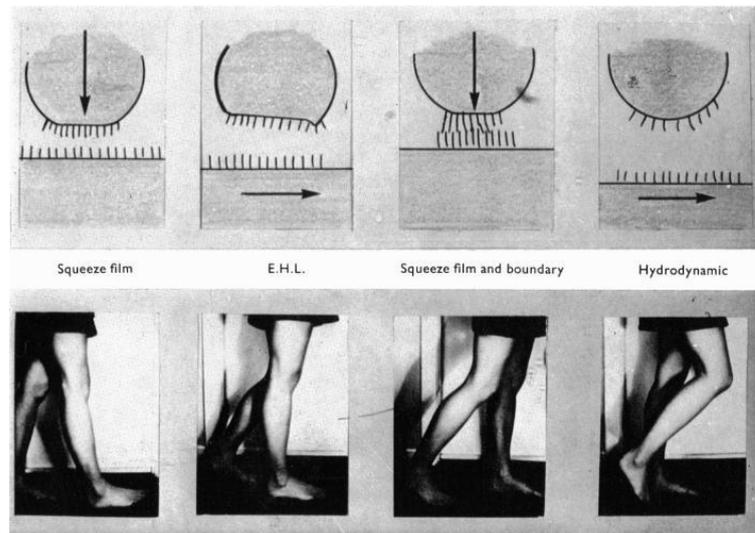


Figura 7.23: modelli di lubrificazione dell'articolazione del ginocchio durante il ciclo del passo.

Nasce dunque l'esigenza anche di uno studio del potere lubrificante dell'idrogel di CMCA quando sottoposto alle varie condizioni di carico relative alle normali attività giornaliere, con particolare attenzione soprattutto ai casi più estremi.

7.6 Valutazione del comportamento sotto carico dell'idrogel

Al fine di valutare il comportamento sotto carico dell'idrogel di CMCA, sono state effettuate delle prove ricostruendo l'articolazione del ginocchio mediante una protesi. Data la mancanza di dati di riferimento per prove analoghe di altri materiali è stata effettuata un'analisi comparativa con acqua.

Per l'applicazione del carico è stata utilizzata una MTS Landmark 370 da 100 KN, macchina idraulica per test di materiali, con una struttura appositamente adattata per applicare la forza alla componente femorale di protesi di ginocchio (Lima Multigen Plus taglia #3) che poggia sul corrispondente inserto in polietilene e componente tibiale (Figure 7.24, 7.25).



Figura 7.24: Strumentazione utilizzata per l'applicazione del carico con la struttura adattata per la protesi di ginocchio.

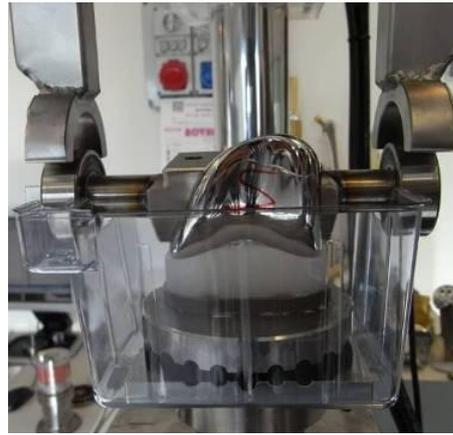


Figura 7.25: Particolare frontale della struttura utilizzata per la realizzazione della prova.

Nello svolgimento delle prove una quantità non predefinita di gel ma sufficiente alla totale immersione delle aree di contatto, è stata depositata mediante l'utilizzo di una siringa sulle cavità meniscali dell'inserto su cui poggiano i condili.

Per misurare aree di contatto e distribuzione di pressione viene utilizzato del Fuji Prescale film (modelli LW e MW campi di misura 1÷10 / 10÷50 MPa): è possibile ottenere la visualizzazione (*pressure imaging*) e la misura della pressione applicata al film in quanto l'area di contatto si colora secondo diverse gradazioni di rosso in funzione dell'entità di pressione locale. La lettura delle gradazioni viene attuata a mezzo di tabelle colorimetriche (Figure 7.26, 7.27).

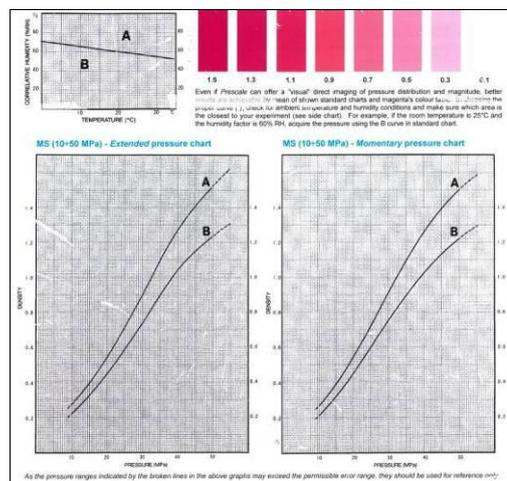


Figura 7.26: tabella colorimetrica per Prescale film MW (10÷50 MPa).

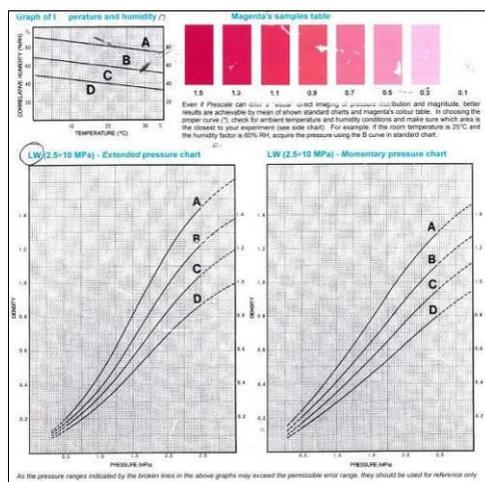


Figura 7.27: tabella colorimetrica per Prescale film LW (1÷10MPa).

Poiché le sezioni di film (rettangoli di circa 4x2,5 cm) devono aderire ad una superficie concava per evitare la sovrapposizione di parte dei lembi laterali e la conseguente evidenziazione di zone ad alta pressione anomale, si è provveduto a tagliare e rimuovere sottili strisce di film a forma triangolare con vertice verso il centro della cartina in modo tale da migliorare l'adesione (Figura 7.28). Inoltre, poiché la sensibilità del film varia in funzione dell'umidità, per renderlo impermeabile le cartine sono state sigillate all'interno di una pellicola di polietilene (spessore 23 μm) (Figura 7.29).

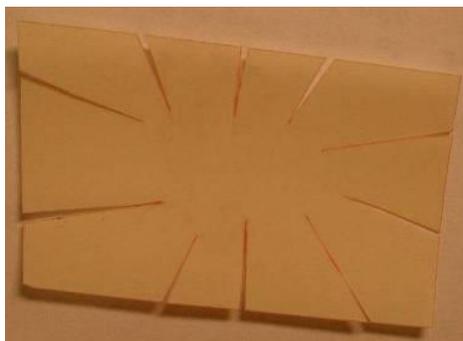


Figura 7.28: Film con ritagli per evitare la sovrapposizione dei lembi.

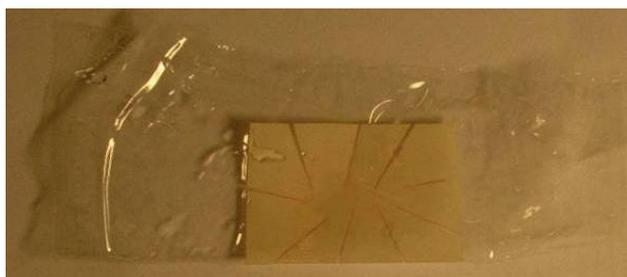


Figura 7.29: film sigillato all'interno di una pellicola di polietilene per renderlo impermeabile.

Le due sezioni di film sono state adagate sul condilo interno ed esterno dell'insero, vi sono stati versati sopra acqua (Figura 7.30) o gel (Figure 7.31, 7.32) e posizionata successivamente la componente femorale (Figura 7.33).



Figura 7.30: preparazione della prova con acqua: l'acqua viene versata sopra le sezioni di film adagate sui condili.



Figura 7.31: preparazione della prova con gel: l'idrogel viene versato sui condili mediante l'uso di una siringa.



Figura 7.32: idrogel disposto sul film per lo svolgimento della prova.



Figura 7.33: strumentazione pronta per l'acquisizione dei dati.

Una volta predisposto il materiale come indicato, si è proceduto alle misure applicando per 5 secondi tramite l'interfaccia software del MTS Landmark 370 carichi progressivi in particolare 2000 N, 3000 N, 4000 N e 5000 N, sia per le prove con l'acqua sia per quelle con il gel, misure ripetute poi utilizzando il film con diversa sensibilità. Le prove sono state effettuate in ambiente con temperatura 22 ± 2 °C e tasso di umidità del $50\% \pm 5\%$. Dalle schede colorimetriche fornite dal produttore del film si associano per le bande di colore le pressioni come indicato in Figura 7.34:

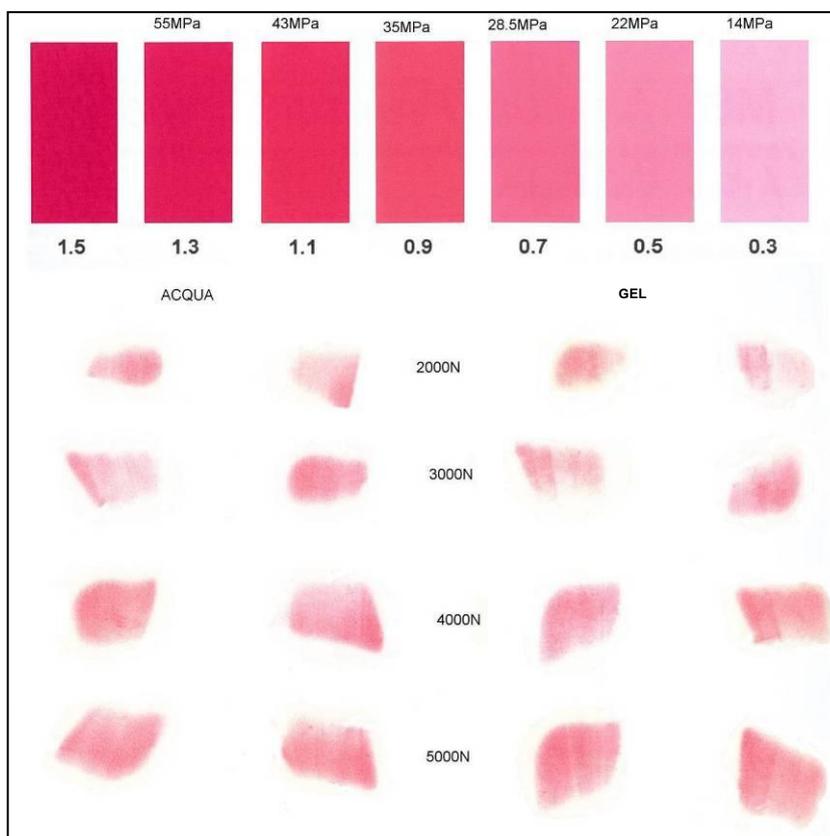


Figura 7.34: scansione delle superfici impresse sul film MW nelle varie prove e comparazione con scala colorimetrica associata ai valori di pressione.

L'analisi a occhio nudo non evidenzia differenze notevoli tra il comportamento dell'idrogel e dell'acqua: si è proceduto quindi ad un'analisi software che permetta di distinguere in modo più preciso i diversi range di pressione. Per meglio evidenziare la distribuzione di pressione sulla superficie d'analisi, è stata modificata la scala colore con colori contrastanti (Figura 7.35):

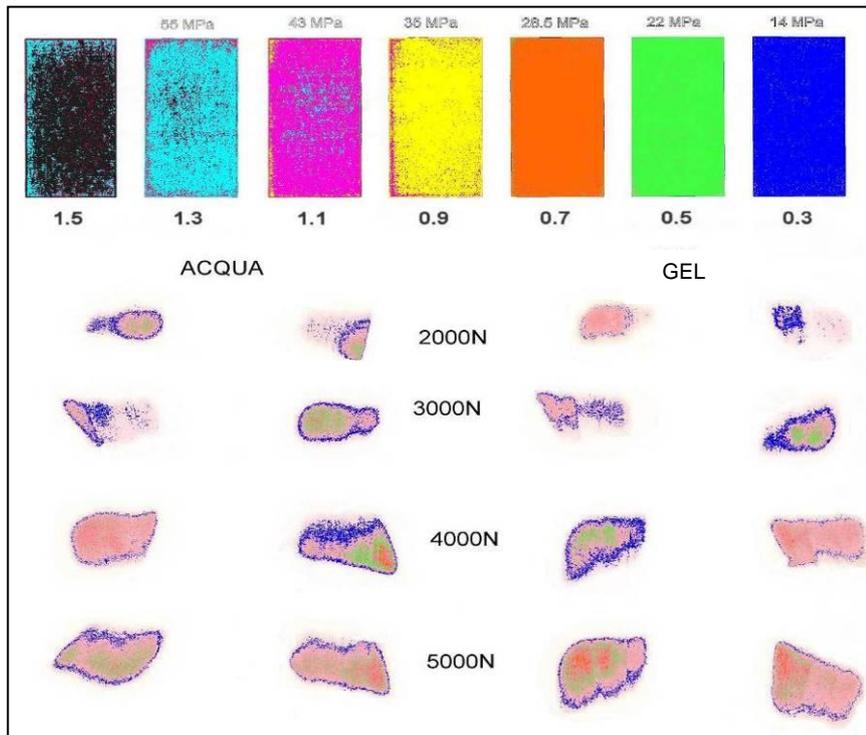


Figura 7.35: distribuzione del carico sulle superfici di contatto (le zone rosa rappresentano pressioni intermedie non rilevabili con questo tipo di modifica).

Quest'analisi puramente qualitativa permette a prima vista di notare che a pressioni via via più elevate corrispondono superfici meno estese sino a 35 MPa, valore oltre il quale non si osservano aree apprezzabili; essa inoltre evidenzia il gradiente di variazione delle pressioni: si può notare, infatti, come in ogni superficie vi sia un'ampia zona di colore rosa tra quelle corrispondenti a 14 MPa e 22 MPa che indica pressioni intermedie tra le due, mentre il passaggio da 22 a 28,5 MPa risulta molto meno graduale.

Si è proceduto successivamente con un'analisi software che calcola le aree delle superfici sottoposte a valori di pressione maggiori o uguali ad un limite imposto, selezionate in base alle gradazioni di colore che presentano (i valori sono da considerarsi con una tolleranza del 10% sulla lettura). Per differenza da tali risultati è possibile calcolare le aree delle superfici suddivise per intervalli di pressione, cui sono

sottoposte, crescenti. Per comodità l'immagine viene riportata in scala di grigi e le aree selezionate vengono evidenziate con il colore rosso per il calcolo delle superfici totali di contatto, ossia superfici sottoposte a un carico di almeno 14 MPa (Figure 7.36, 7.37):

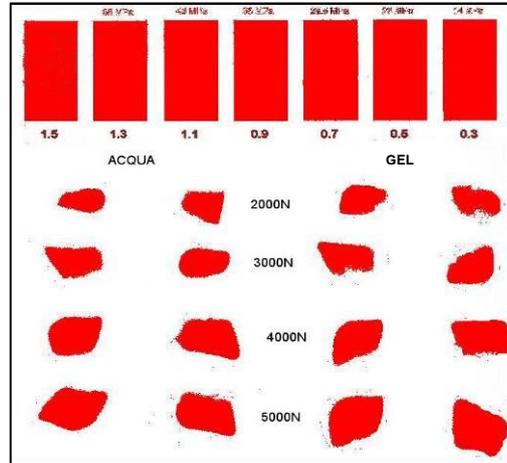


Figura 7.36: superfici di contatto sottoposte ad almeno 14MPa.

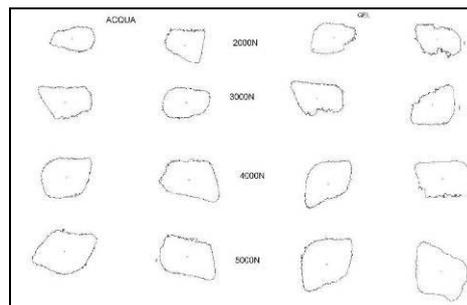


Figura 7.37: contorni delle superfici di contatto elaborate dal software per il calcolo delle aree.

In Tabella 7.2 si riportano i valori delle suddette superfici in mm^2 .

Tabella 7.2: Aree in mm^2 delle superfici totali di contatto sottoposte ad almeno 14MPa.

	ACQUA		GEL	
	sx	dx	sx	dx
2000N	48,846	60,940	63,857	63,811
3000N	79,190	70,937	79,158	77,882
4000N	100,687	110,484	94,931	102,361
5000N	118,889	112,763	124,485	128,852

Calcolo delle superfici sottoposte a una pressione P compresa nell'intervallo considerato: $14 \text{ MPa} \leq P < 22 \text{ MPa}$ (Figura 7.38).

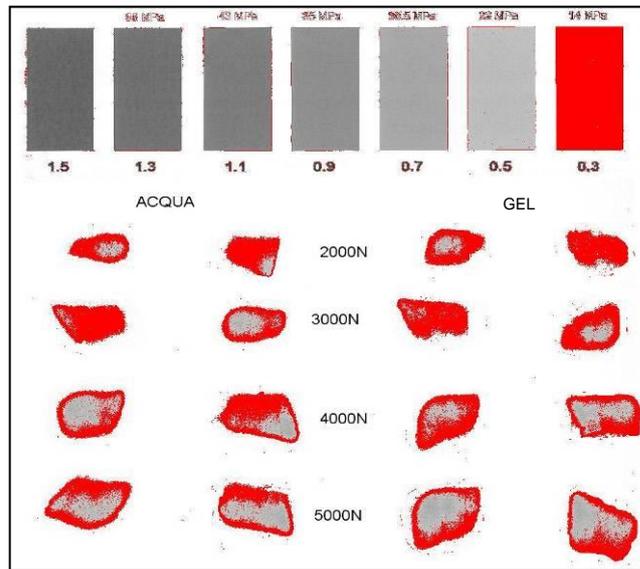


Figura 7.38: superfici sottoposte ad una pressione P : $14 \text{ MPa} \leq P < 22 \text{ MPa}$.

La Tabella 7.3 riporta i valori delle aree delle superfici sottoposte a una pressione P compresa nell'intervallo considerato: $14 \text{ MPa} \leq P < 22 \text{ MPa}$.

Tabella 7.3: Aree in mm^2 delle superfici sottoposte a una pressione P : $14 \text{ MPa} \leq P < 22 \text{ MPa}$.

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	40,300	54,436	52,169	63,811
3000N	77,250	47,728	77,616	62,721
4000N	57,138	82,013	74,999	61,752
5000N	77,988	64,033	67,381	72,353

Calcolo delle superfici sottoposte a pressioni P comprese nell'intervallo considerato: $22 \text{ MPa} \leq P < 28,5 \text{ MPa}$ (Figura 7.39).

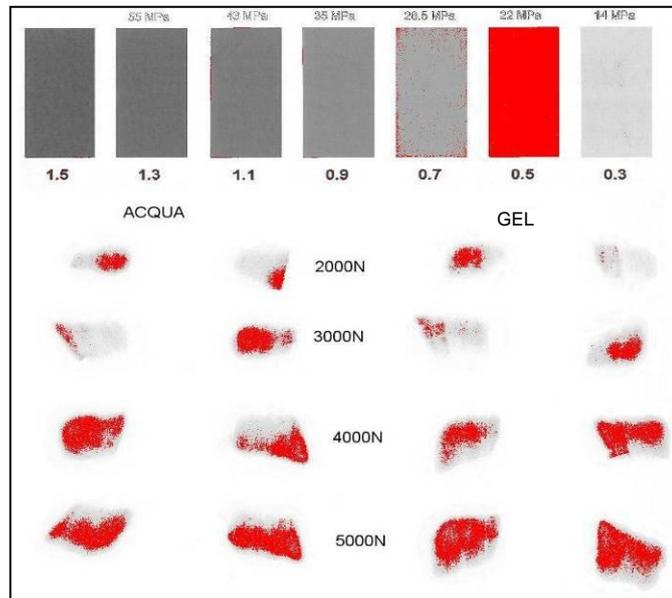


Figura 7.39: Superfici sottoposte ad una pressione P : $22 \text{ MPa} \leq P < 28,5 \text{ MPa}$

I corrispondenti valori numerici delle aree in mm^2 sono riportati in Tabella 7.4:

Tabella 7.4: Aree in mm^2 delle superfici sottoposte a pressioni P : $22 \text{ MPa} \leq P < 28,5 \text{ MPa}$

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	9,546	6,504	11,688	-
3000N	1,940	23,209	1,542	15,161
4000N	43,549	26,408	19,932	40,609
5000N	40,901	47,919	52,403	54,117

Calcolo delle superfici cui sono applicate pressioni superiori a 28,5 MPa (Figura 7.40):

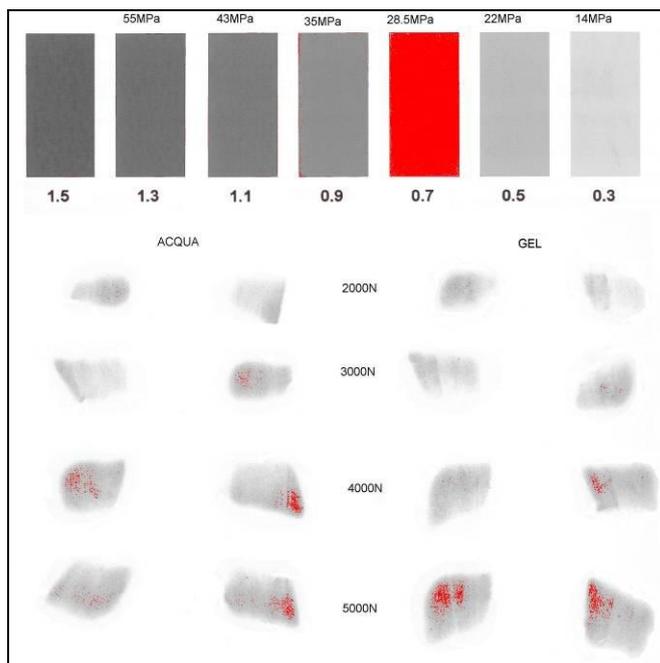


Figura 7.40: Superfici sottoposte a pressioni superiori a 28,5 MPa

La Tabella 7.5 riporta i valori in mm² di tali superfici:

Tabella 7.5: Aree in mm² delle superfici sottoposte a pressioni superiori a 28,5 Mpa

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	-	-	-	-
3000N	-	-	-	-
4000N	-	1,245	-	-
5000N	-	0,679	3,627	1,876

Come si può notare nella tabella precedente alcune aree sono di dimensioni troppo ridotte per poter essere calcolate e considerate (il limite minimo è 0,2 mm²). Lo stesso si verifica per le aree che indicano pressioni superiori: quindi si è scelto di terminare l'analisi a questo punto e passare all'interpretazione dei dati.

Le prove effettuate con il Prescale film più sensibile, ossia con campo di misura 1-10 MPa risultano meno significative delle precedenti. Si riportano soltanto i risultati del carico a 2000 N l'unico a mostrare una leggera differenza nella distribuzione del carico tra acqua e idrogel (Figura 7.41):

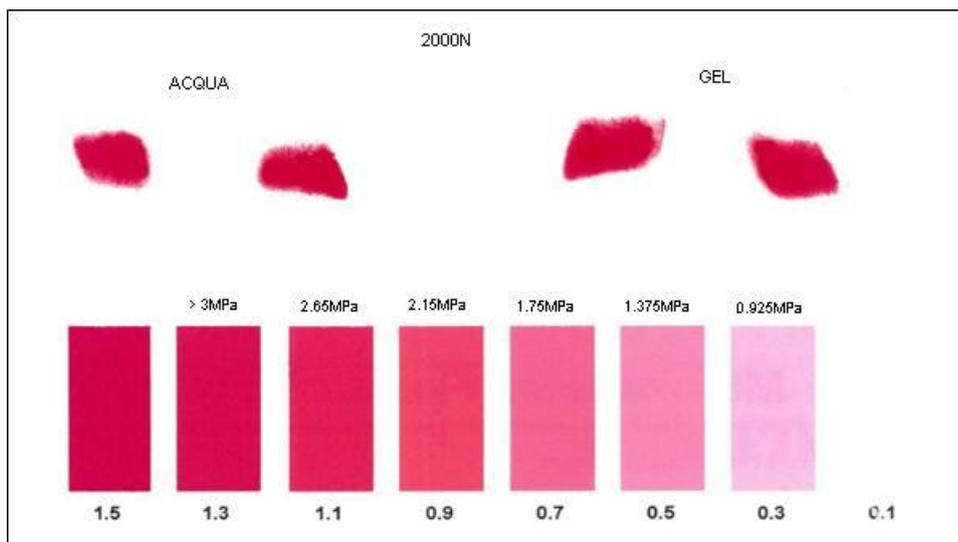


Figura 7.41: scansione superfici impresse sul film LW risultanti dall'applicazione di 2000 N e comparazione con scala colorimetrica associata ai valori di pressione.

Il calcolo delle superfici totali di contatto fornisce i seguenti risultati (Figure 7.42, 7.43):

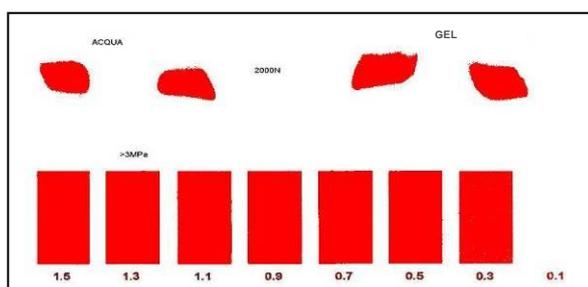


Figura 7.172: superfici totali di contatto.

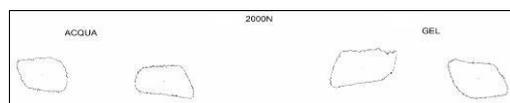


Figura 7.43: contorni delle superfici di contatto.

La tabella seguente riporta i valori numerici in mm² delle aree di contatto totali (Tabella 7.6):

Tabella 7.6: Aree in mm² delle superfici di contatto

	ACQUA		GEL	
	SX	dx	SX	dx
2000N	81,393	86,609	111,254	99,247

Calcolo delle superfici sottoposte a pressioni inferiori a 1,75MPa (Figura 7.44):

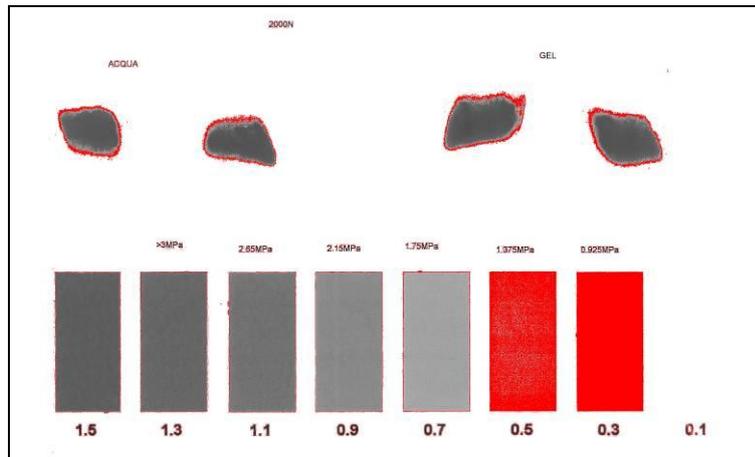


Figura 7.44: Superfici che risentono di pressioni inferiori a 1,75 MPa.

Le aree occupate da tali superfici sono riportate in Tabella 7.7.

Tabella 7.7: Aree in mm² delle superfici che risentono di pressioni inferiori a 1,75MPa

	ACQUA		GEL	
	sx	dx	sx	dx
2000N	18,182	10,994	17,208	13,543

Calcolo delle superfici su cui sono applicate pressioni P comprese nell'intervallo considerato: $1,75 \text{ MPa} \leq P < 2,15 \text{ MPa}$ (Figura 7.45).

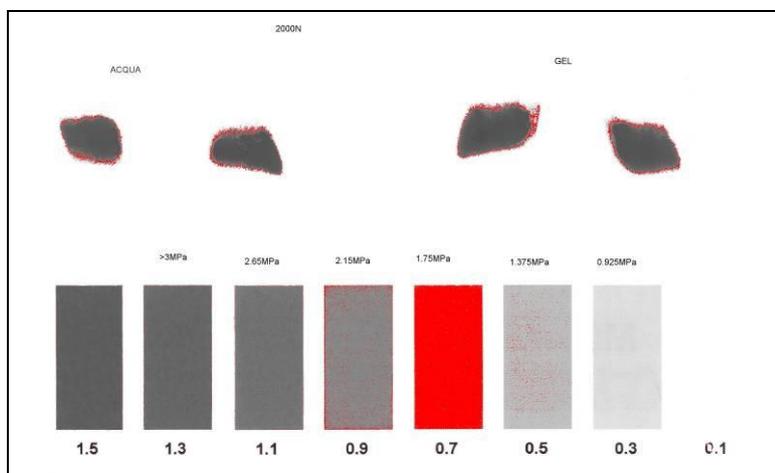


Figura 7.45: Superfici sottoposte ad una pressione P: $1,75 \text{ MPa} \leq P < 2,15 \text{ MPa}$.

I corrispondenti valori numerici in mm² di tali aree sono riportati in Tabella 7.8.

Tabella 7.8: Aree in mm² delle superfici che risentono di pressioni P : $1,75 \text{ MPa} \leq P < 2,15 \text{ MPa}$

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	0,68	6,19	7,748	6,417

Calcolo delle superfici cui sono applicate pressioni P comprese nell'intervallo considerato: $2,15 \text{ MPa} \leq P < 2,65 \text{ MPa}$ (Figura 7.46).

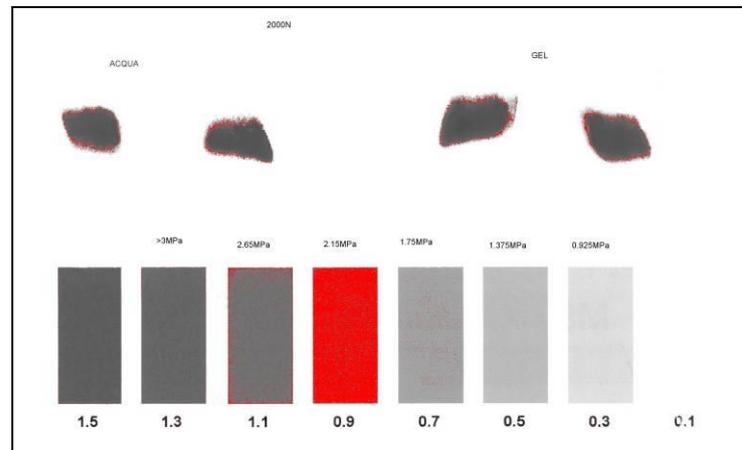


Figura 7.46: Superfici sottoposte a pressioni P : $2,15 \text{ MPa} \leq P < 2,65 \text{ MPa}$.

La Tabella 7.9 riporta i valori numerici corrispondenti alle aree di tali superfici.

Tabella 7.9: Aree in mm² delle superfici sottoposte a pressioni P : $2,15 \text{ MPa} \leq P < 2,65 \text{ MPa}$

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	4,041	5,292	5,488	6,113

Calcolo delle superfici che risentono di pressioni P comprese nell'intervallo considerato: $2,65 \text{ MPa} \leq P < 3 \text{ MPa}$ (Figura 7.47).

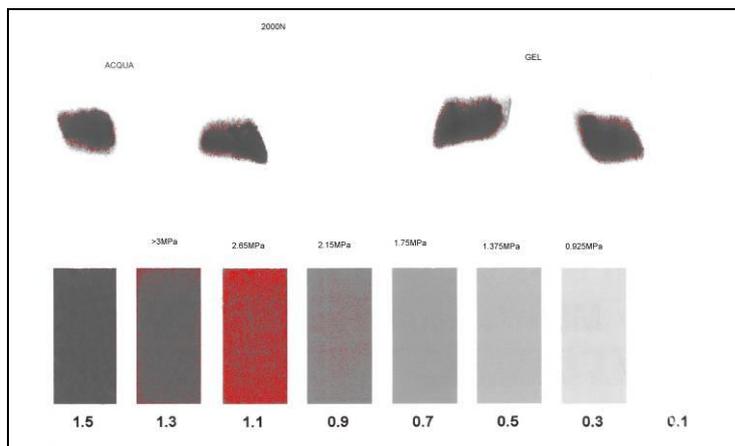


Figura 7.47: Superfici sottoposte a pressioni P : $2,65 \text{ MPa} \leq P < 3 \text{ MPa}$

Le aree di tali superfici espresse in mm^2 sono riportate in Tabella 7.10.

Tabella 7.10: Aree in mm^2 delle superfici sottoposte a pressioni P : $2,65 \text{ MPa} \leq P < 3 \text{ MPa}$.

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	4,621	4,502	5,256	5,543

Dalla Figura 7.48 emerge come la gran parte delle superfici di contatto sia sottoposta a pressioni maggiori di 3 MPa:

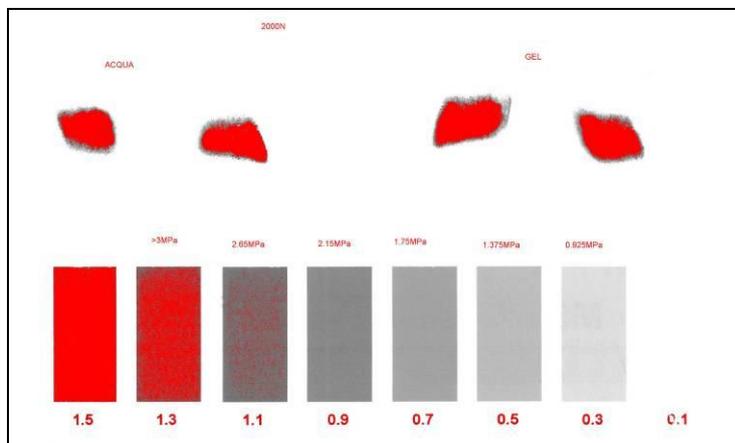


Figura 18.48: Superfici che risentono di pressioni superiori a 3MPa.

I valori numerici delle aree suddette confermano il comportamento riscontrato tramite esame visivo (Tabella 7.11):

Tabella 7.11: Aree in mm² delle superfici sottoposte a pressioni maggiori di 3 MPa.

	ACQUA		GEL	
	<i>sx</i>	<i>dx</i>	<i>sx</i>	<i>dx</i>
2000N	53,869	59,631	75,554	67,631

Analizzando nel complesso i risultati ottenuti si evince che le prove svolte possano considerarsi soltanto qualitative poiché i dati numerici non risultano significativi. Questo nasce dall'evidente difficoltà di utilizzare un sistema per prove a secco e adattarlo alle specifiche necessità richieste per testare il gel. Svariati quindi sono i fattori che rendono poco significativi i risultati ottenuti:

- il posizionamento del Prescale film risulta troppo poco preciso rendendo così non ripetibile la prova in condizioni analoghe;
- la necessità di asportare parte del film per evitare la sovrapposizione dei lembi comporta un eccessivo e prolungato contatto del film con l'ambiente esterno e con strumenti che esercitano pressione (forbici) andando a ledere l'integrità della cartina e compromettendone probabilmente la funzionalità;
- la mancanza di confinamento del gel tra cavità e condilo comporta la dispersione dello stesso all'aumentare del carico al di fuori della protesi, modificando quindi le condizioni ambientali dall'inizio al termine della prova;
- la mancanza di precisione nella disposizione del film e la perdita di orientazione nella catalogazione delle cartine non permette l'analisi di una verosimile distribuzione del carico;
- non si rileva un andamento regolare nella variazione delle superfici: la funzione di *shock absorbing* richiesta al gel dovrebbe presumibilmente comportare un aumento delle aree a minor pressione per la distribuzione più omogenea del carico su tutta la superficie messa a disposizione dalla miscela e quindi una diminuzione delle aree che risentono di elevata pressione. Questo comportamento non è riscontrato nei risultati delle prove: le variazioni di

superficie non rispettano un andamento regolare e non permettono una valutazione e una previsione della funzionalità del gel in vivo;

- il tempo di applicazione del carico (5 sec) non permette di evidenziare l'effetto della viscosità dell'idrogel.

Affinché le prove effettuate possano contribuire ad una valutazione qualitativa e quantitativa che fornisca risultati significativi risulta necessario affrontare le problematiche appena elencate trovando soluzioni adeguate ed in particolare:

- trovare una metodologia che permetta un posizionamento preciso del Prescale film e quindi ripetibile;
- utilizzare un film sensibile alla pressione che permetta il minor intervento di variabili esterne prima del suo utilizzo;
- ripetere le prove con il gel almeno 3 volte per ogni differente carico per ottenere misure più precise e confrontabili;
- effettuare prove in immersione in modo da simulare il comportamento in vivo del liquido sinoviale all'interno delle capsule e per poter assicurare la presenza della stessa quantità di miscela in ogni prova;
- effettuare prove comparate con sostanze più simili al gel di CMCA anche quanto ad uso ad esempio acido ialuronico;
- utilizzare un software che permetta una migliore interpretazione delle superfici impresse nel film riuscendo ad individuare tutte le gradazioni di colore presenti.

7.6 Valutazione del coefficiente d'attrito dell'idrogel

Nell'ambito della valutazione del potere lubrificante dell'idrogel di CMCA è stata condotta una prova con lo scopo di determinare il coefficiente di attrito dell'idrogel simulando il movimento di flessione ed estensione dell'articolazione del ginocchio mediante l'utilizzo di protesi e adeguata strumentazione di rilevazione. È stata utilizzata una protesi di ginocchio Lima Multigen Plus taglia #3 associata ad una struttura appositamente adattata per la MTS Landmark 370 da 100 KN in modo tale da

poter anche applicare diversi carichi sulla componente femorale del dispositivo protesico (Figura 7.49).



Figura 7.49: Strumentazione utilizzata per la prova: MTS Landmark 370 con struttura appositamente adattata per l'applicazione del carico su una protesi di ginocchio.

La rotazione del componente è stata eseguita manualmente (circa 45°) per 3 volte ad ogni carico e una chiave dinamometrica ha permesso la misurazione della coppia torcente e la registrazione della sua variazione tramite interfaccia software (Figura 7.50).



Figura 7.50: funzionamento della strumentazione: la rotazione della componente protesica femorale viene indotta manualmente e il momento torcente registrato tramite software.

In mancanza di dati comparativi per il liquido sinoviale, la prova è stata effettuata per l'idrogel di CMCA e ripetuta a secco, con acqua e con una soluzione di CMC per confronto. Per simulare la condizione dell'ambiente articolare nel caso delle soluzioni la prova è stata condotta con la protesi semi-immersa nelle stesse (Figure 7.51, 7.52 e 7.53).

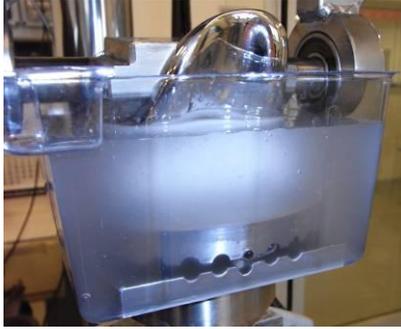


Figura 7.51: Protesi semi immersa in idrogel di CMCA.



Figura 7.52: Protesi semi immersa in acqua



Figura 7.53: Protesi semi immersa in una soluzione di CMC.

La prova si è articolata nel modo seguente: per ogni sostanza sono stati applicati progressivamente 4 carichi (1000 N, 2000 N, 3000 N, 4000 N) per ognuno dei quali è stata misurata la variazione del momento torcente nel corso di 3 flessioni-estensioni successive con ampiezza di circa 45° . Si riporta in diversi grafici l'andamento della coppia torcente per acquisizioni successive durante la rotazione (la fase discendente delle curve rappresenta la flessione mentre la fase ascendente l'estensione) e si confrontano i valori a secco, per acqua, idrogel e soluzione di CMC a parità di carico applicato.

Carico applicato: 1000N (Figura 7.54).

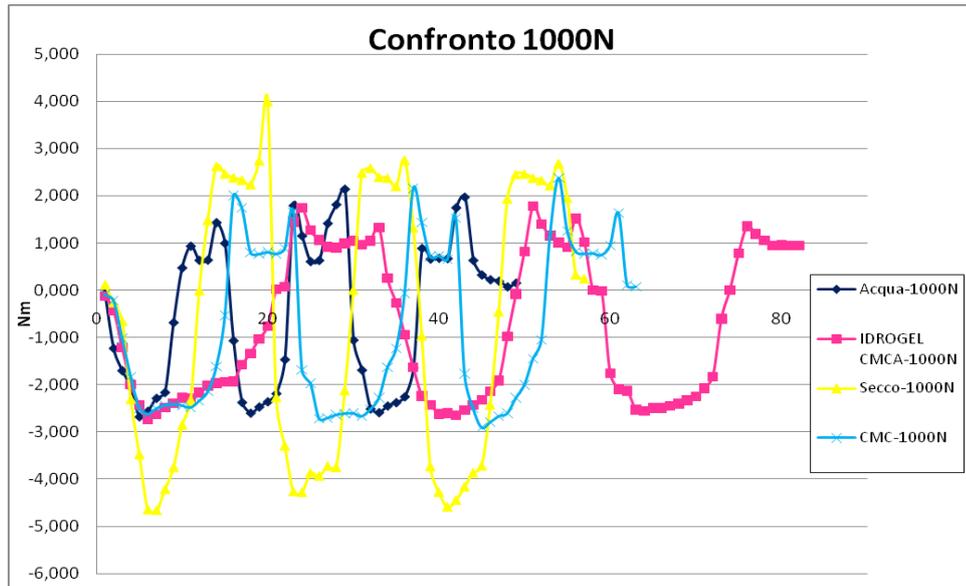


Figura 7.54: Andamento della coppia torcente per un carico applicato pari a 1000 N.

Carico applicato: 2000N (Figura 7.55).

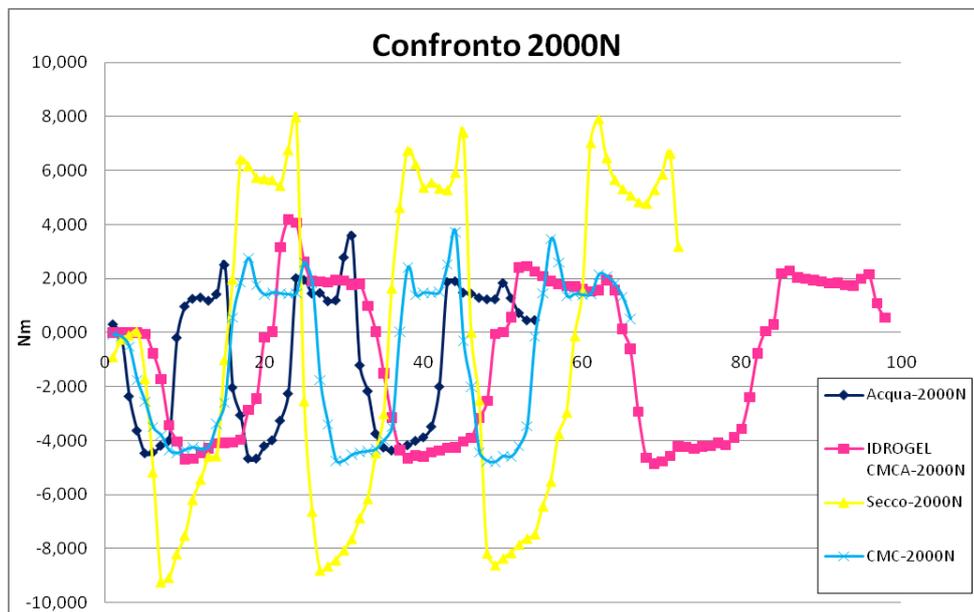


Figura 7.55: Andamento della coppia torcente per un carico applicato pari a 2000 N.

Carico applicato: 3000N (Figura 7.56).

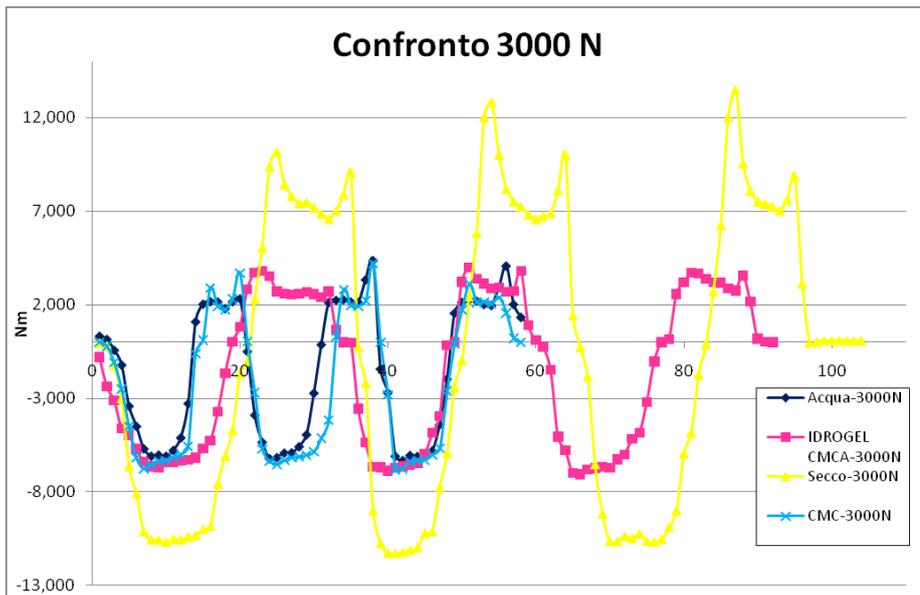


Figura 7.56: Andamento della coppia torcente per un carico applicato pari a 3000 N.

Carico applicato: 4000N (Figura 7.57).

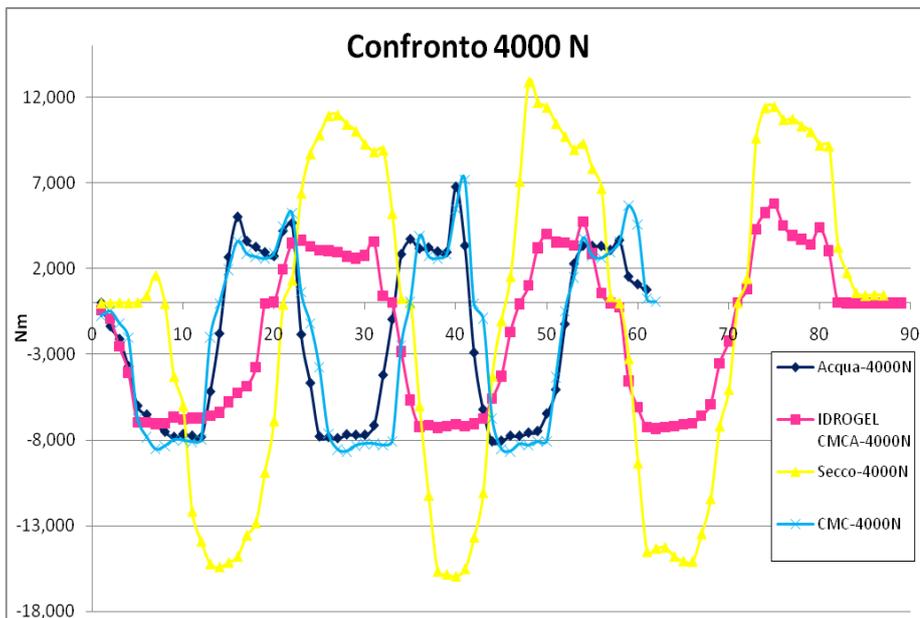


Figura 7.57: Andamento della coppia torcente per un carico applicato pari a 4000 N.

Dai dati relativi al momento torcente secondo la seguente relazione si ricavano i valori del coefficiente d'attrito per ogni acquisizione (frequenza di acquisizione: 1 punto / 200 ms):

$$\text{forza d'attrito } F_A = T / r$$

con T: momento torcente

r: distanza tra il fulcro e il punto di applicazione della forza. Per la struttura della strumentazione utilizzata $r = 0,028$ m

$$\text{coefficiente d'attrito } K = F_A / F_N$$

con F_A : forza d'attrito

F_N : carico applicato (1000 N – 2000 N – 3000 N – 4000 N).

In Figura 7.58 si confrontano i coefficienti d'attrito relativi all'idrogel di CMCA per i diversi carichi.

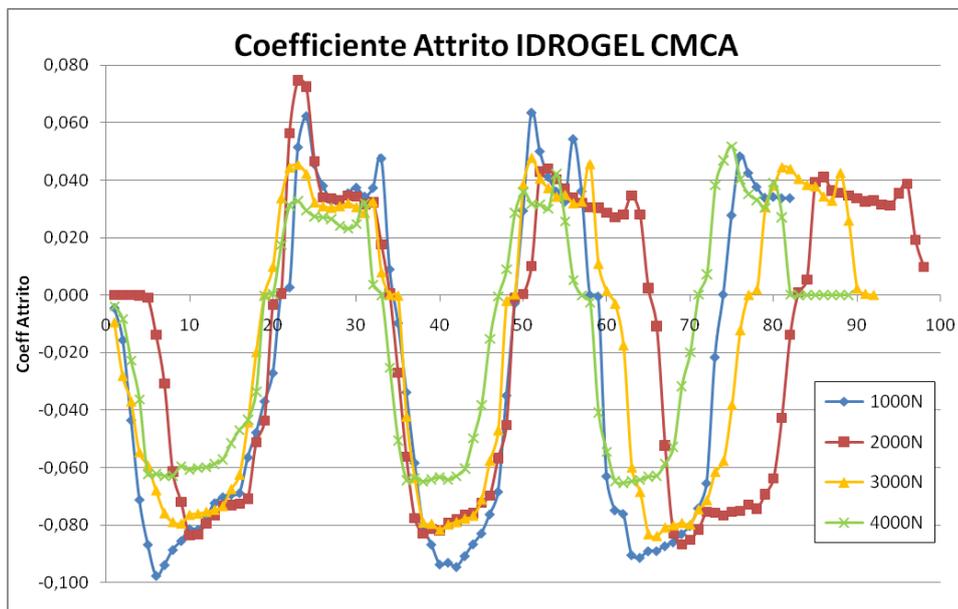


Figura 7.58: andamento del coefficiente d'attrito dell'idrogel di CMCA per i diversi carichi applicati.

Dai dati precedenti vengono ricavati i valori medi del coefficiente d'attrito in flessione (valori negativi) e in estensione (valori positivi) ai diversi carichi che vengono messi a confronto (Figura 7.59).

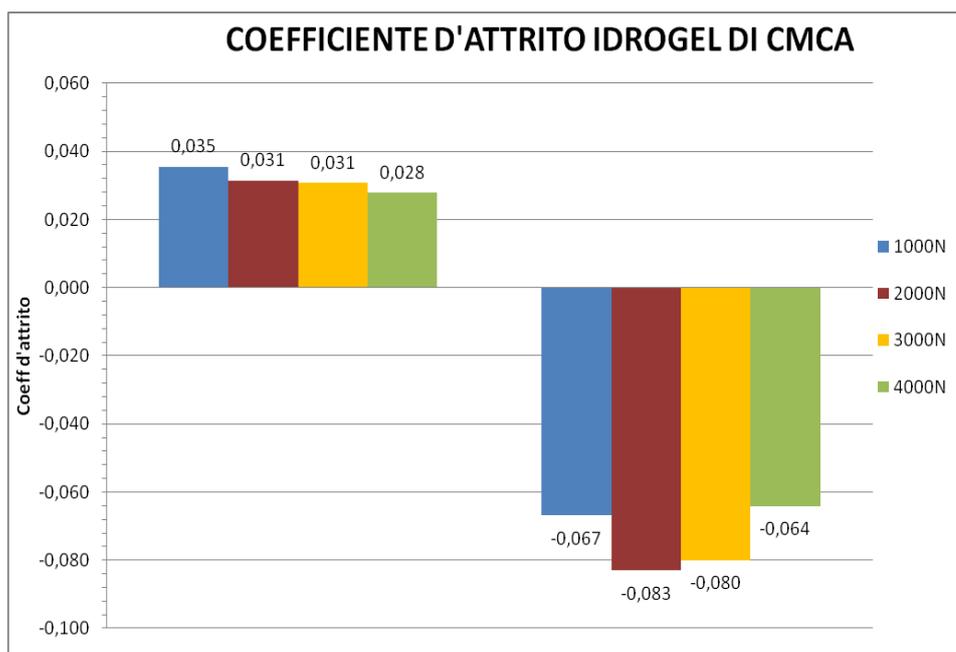


Figura 7.59: confronto tra il coefficiente d'attrito in flessione (valori negativi) e in estensione (valori positivi) dell'idrogel di CMCA ai diversi carichi applicati.

Prendendo come riferimento le prove effettuate a 4000 N si calcolano i valori medi dei coefficienti d'attrito come sopra, a secco, per l'idrogel di CMCA, l'acqua e la soluzione di CMC e si riportano in istogramma (Figura 7.60).

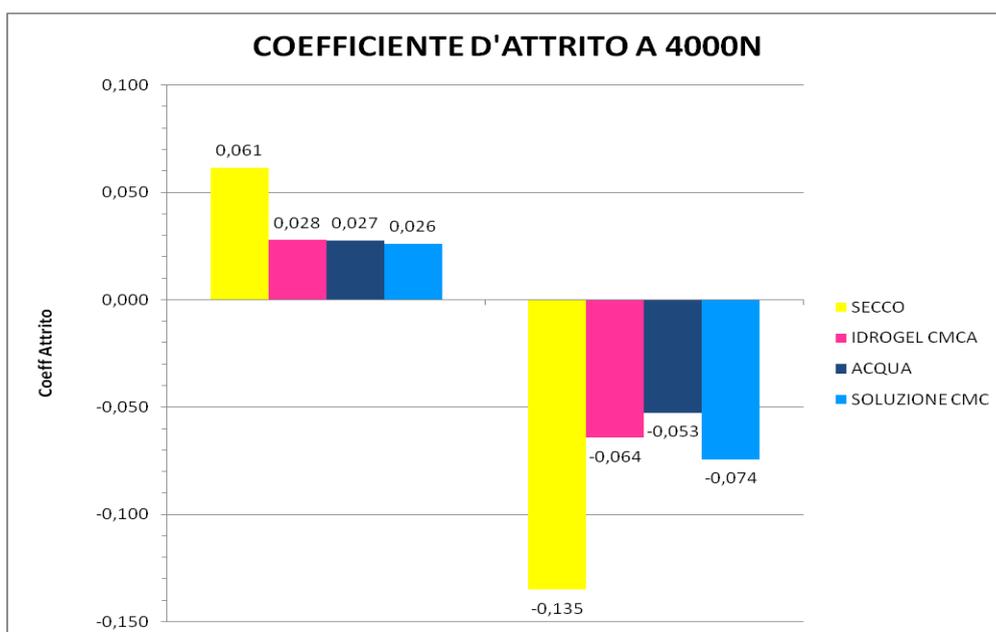


Figura 7.60: confronto tra i valori medi del coefficiente d'attrito in flessione (valori negativi) ed estensione (valori positivi) per le diverse sostanze per il carico di 4000 N.

La prova effettuata si è rivelata non del tutto idonea all'obiettivo voluto: non essendovi la possibilità di controllare la velocità e l'ampiezza della torsione, in quanto prodotta manualmente, non è possibile avere regolarità nell'azione di rotazione. Questo impedisce di effettuare un confronto preciso tra le diverse situazioni analizzate. Sarebbe auspicabile, infatti, poter associare la coppia registrata all'angolo di torsione al quale è acquisita, essendovi un comportamento differente a seconda del grado di flessione della protesi. Così facendo si potrebbero confrontare in modo più preciso le diverse soluzioni considerate e le differenti risposte a carichi diversi. Infatti, mentre vi è notevole differenza tra secco e idratato, tra i sistemi idratati questo tipo di misure non sembra essere idoneo a registrare differenze significative.

Per l'idrogel di CMCA comunque si nota la tendenza del coefficiente d'attrito a calare all'aumentare del carico: tale incremento di performance all'aumentare del carico è probabilmente dovuto alla forma di gel e si ritiene possa migliorare ulteriormente in condizioni di sollecitazione dinamica, anziché statica, per la natura viscoelastica non newtoniana dell'idrogel.

Capitolo 8

Biocompatibilità

Con riferimento a quanto già spiegato nel capitolo 1, il prodotto oggetto di questo progetto è da considerarsi un dispositivo medico trattandosi di un idrogel da iniettare all'interno dell'articolazione del ginocchio esplicando funzioni meccaniche di lubrificazione e *shock absorbing*. Come già accennato, esso è classificato nella classe III, R8 tra i dispositivi a rischio più alto; al fine di ottenere un prodotto il cui rischio sia il minore possibile e comunque superato dal beneficio terapeutico, è necessario considerare, per quanto possibile, ogni potenziale evento in cui il dispositivo possa essere fonte di pericolo. Parallelamente alla caratterizzazione chimico-fisica del materiale, quindi, in previsione di una richiesta di attestazione di conformità sono state condotte alcune prove riguardo la valutazione della biocompatibilità dell'idrogel.

La prima prova che deve essere considerata per la risposta biologica iniziale è il test di citotossicità: considerato infatti il prolungato contatto tra il dispositivo e i tessuti, è necessario valutare mediante l'utilizzo di tecniche di coltura cellulare gli effetti causati sulle cellule stesse, se e in quale misura si verifica lisi cellulare o inibizione della crescita cellulare.

Essendo il dispositivo in questione impiantabile, fondamentali sono ovviamente le prove di impianto per valutare gli effetti patologici locali sul tessuto vivente a livello macroscopico e microscopico del campione impiantato.

8.1 Prove in vitro

Oltre ad una caratterizzazione chimico-fisica del polimero è necessario procedere ad una valutazione del comportamento di cellule messe a contatto con il polimero stesso, al fine di ottenere una valutazione dell'eventuale tossicità del prodotto, che ne comprometterebbe l'applicazione in ambito medico.

È noto che nei programmi di sviluppo dei tessuti e nei processi riparativi e rigenerativi la funzionalità cellulare è regolata da molteplici fattori di tipo biochimico, meccanico e topografico e che vi è inoltre un'interazione tra le cellule e la matrice extracellulare (ECM), struttura altamente dinamica e soggetta a continuo rimodellamento. Per favorire i processi riparativi e rigenerativi è necessario ricreare un microambiente extracellulare che assicuri condizioni idonee a garantire la funzionalità cellulare; si vuole quindi verificare se la CMCA può costituire uno scaffold che permette alle cellule di assumere caratteristiche morfofunzionali vicine a quelle della condizione nativa, quindi di proliferare, differenziare, produrre ECM, e che sostituisca lo scaffold originale man mano che questo viene degradato, instaurando allo stesso tempo le corrette interazioni cellula-cellula e cellula-ECM. Da studi precedenti [Leone *et al.*, 2008] si è visto che la CMCA assicura un microambiente per la coltura dei condrociti molto simile a quello dell'Acido Ialuronico con il vantaggio inoltre di essere degradata molto più lentamente e quindi di permanere per il tempo necessario ad avere un adeguato ripopolamento cellulare e sintesi di nuova ECM. Nello specifico in Figura 8.1 sono riportati i risultati di un test condotto in vitro che mette a confronto la proliferazione di condrociti e l'attività metabolica di colture trattate con idrogel di CMCA, con idrogel di Hyal e di colture non trattate (CTR) dopo 14 giorni. Il grafico del test di proliferazione WST1 mostra che i condrociti hanno proliferato negli idrogel di CMCA e di Hyal senza notevoli differenze statistiche mentre l'idrogel aumenta la produzione di Collagene II mostrando valori significativamente più alti rispetto alla coltura di controllo. Inoltre la valutazione del rilascio di mediatori chimici dell'infiammazione come IL-1, ha mostrato un comportamento dell'idrogel di CMCA pressoché analogo al controllo.

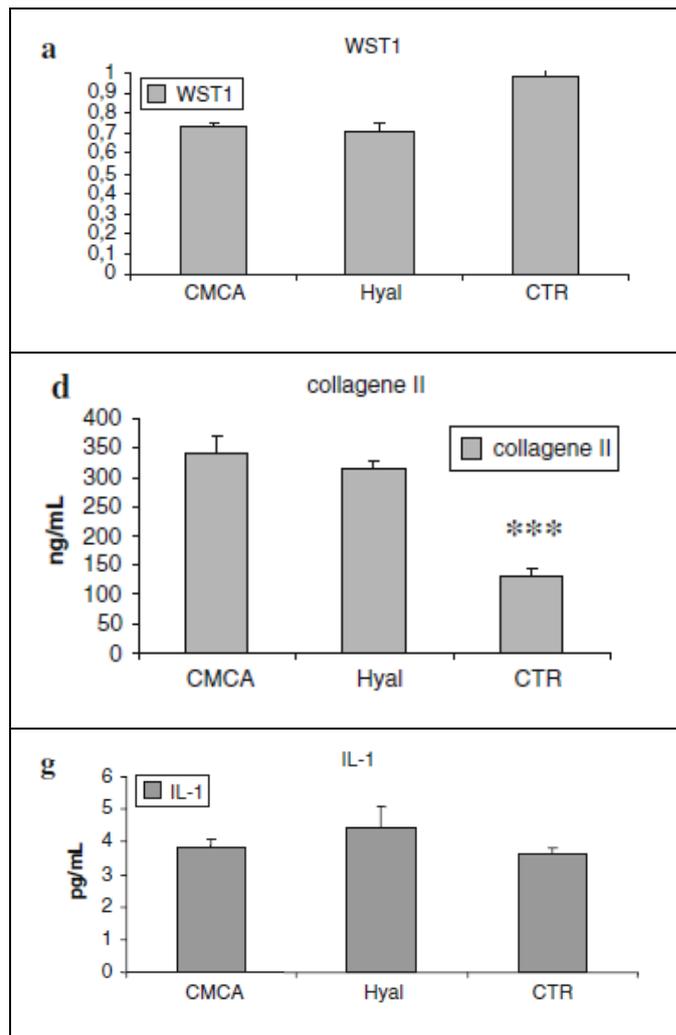


Figura 8.1 : test di proliferazione WST1 (a), produzione di collagene II (d) e rilascio di IL-1 (g) di colture trattate con idrogel di CMCA, con idrogel di Hyal e di colture non trattate (CTR) a confronto dopo 14 giorni.

Sono stati inoltre allestiti test più approfonditi da condurre in vitro il cui scopo è effettuare una caratterizzazione del comportamento di condrociti umani maturi coltivati in CMCA e in particolare valutare la capacità di produrre molecole della ECM, come il collagene II ed aggregano. Data la ridotta capacità proliferativa dei condrociti, che limita la potenzialità rigenerativa della cartilagine, si sfrutta l'utilizzo di cellule mesenchimali staminali umane (HMSC) per la loro capacità proliferativa e di differenziare in senso condrocitario. Si procede quindi alla caratterizzazione del comportamento di HMSC coltivate in CMCA valutandone proliferazione e differenziazione monitorando l'espressione di marker specifici come Sox 9. Più precisamente i modelli sperimentali utilizzati prevedono l'allestimento di colture 2D in

condizioni standard e 3D in CMCA (varie forme) sia di condrociti umani maturi che di HMSC analizzate per quattro settimane. Le valutazioni effettuate a intervalli regolari di 1 settimana dall'inizio al termine della coltura sono: la proliferazione (MTT assay), l'apoptosi (Annexin V assay) il metabolismo energetico cellulare (microscopia di autofluorescenza bi- e tridimensionale), il profilo di espressione genica (DNA array). Inoltre, tramite l'utilizzo di tecniche di microscopia di immunofluorescenza bi- e tridimensionale, l'espressione di Sox 9, di aggregano, di enzimi che degradano la ECM, l'espressione e la distribuzione di integrine di membrana responsabili delle interazioni cellula-cellula e cellula-ECM, nonché l'espressione e distribuzione del network di actina, che svolge un ruolo di fondamentale importanza nei processi di adesione/migrazione.

Alla conclusione della prima fase del progetto le prove in vitro sono ancora in corso e non si hanno a disposizione dati definitivi utili per una valutazione, tuttavia i risultati preliminari hanno dato esito confortante (Figura 8.2).

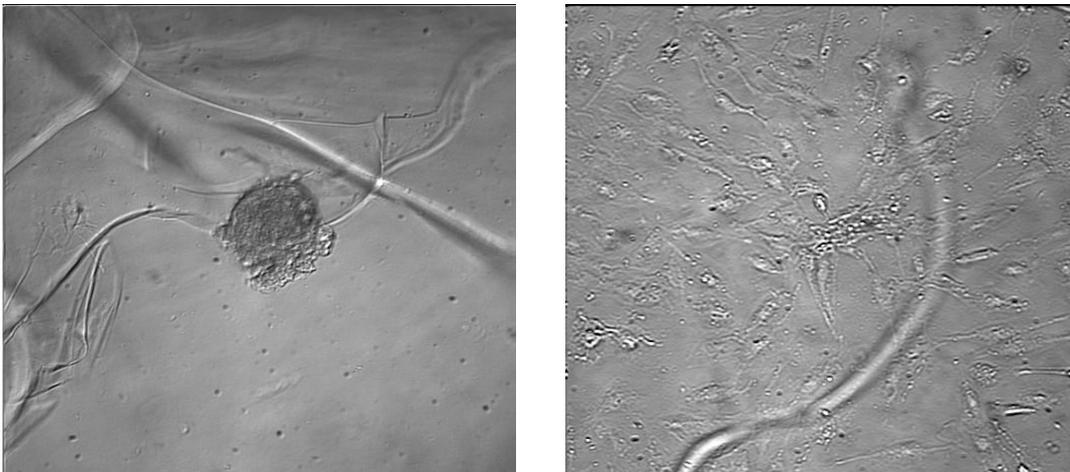


Figura 8.2: 1 settimana: cellula con estroflessioni della membrana plasmatica; cellule che hanno proliferato

8.2 Prove in vivo

La cartilagine ha una capacità rigenerativa estremamente limitata in seguito ad una lesione. Ciò è spesso attribuito all'assenza di vascolarizzazione, innervazione e cellule indifferenziate per iniziare e propagare la risposta di guarigione. Spesso

vengono usati modelli animali pre-clinici per valutare potenziali terapie cliniche. Si è scelto di condurre uno studio pilota su un singolo animale per valutare le differenze tra la creazione di difetti condrali e osteocondrali sul condilo mediale nella successiva risposta all'iniezione di idrogel di CMCA. Sono stati creati un difetto condrale e uno osteocondrale in una pecora adulta, dopo 1 settimana si è proceduto con l'iniezione di idrogel e dopo 4 settimane l'animale è stato soppresso e si è proceduto alla raccolta e l'analisi dei siti con i difetti.

Dal punto di vista istologico a 4 settimane dall'iniezione di idrogel nessuno dei 2 difetti era guarito e i siti presentavano le caratteristiche di seguito descritte.

Difetto condrale:

- assenza di idrogel nei difetti;
- mancanza di qualsiasi evidenza istologica di riparazione nelle immagini di Figura 8.3;
- nessun cambiamento all'osso sub condrale;
- modifiche nella cartilagine ai margini del difetto in linea con l'osteoartrosi.



Figura 8.3 : colorazione tetra cromatica del difetto condrale a 4 settimane dopo l'iniezione di idrogel. Si notano prove di cambiamenti degenerativi nella cartilagine adiacente con la presenza di una fessura.

Difetto osteocondrale:

- idrogel presente nei difetti nell'osso spongioso nei lati e porzioni distali del difetto;
- tessuto vascolare fibroso - interfaccia di tessuto fibroso nel difetto;
- mancanza di ematoma;

- formazione di nuovo tessuto osseo intorno al restante idrogel all'interno del tessuto; idrogel ben tollerato;
- alcune modifiche nella cartilagine ai margini del difetto in linea con l'osteoartrite;
- nuova vascolarizzazione all'interfaccia con i margini del difetto (Figura 8.4).

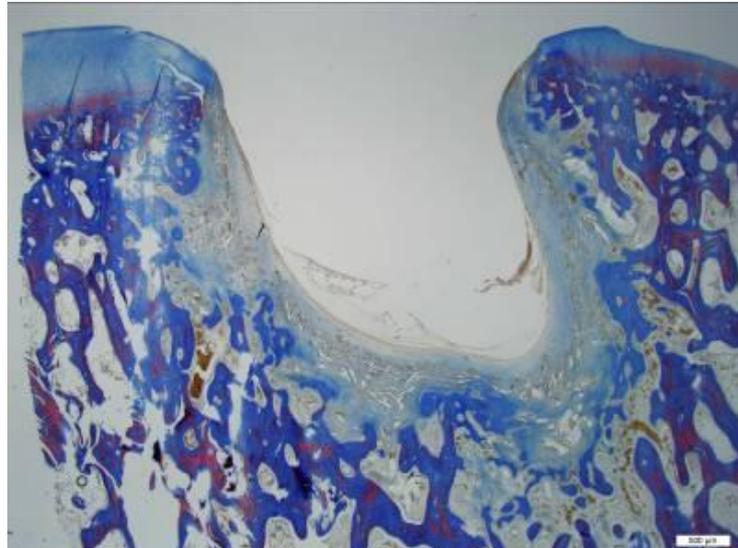


Figura 8.4 : immagine tetra cromatica del difetto osteocondrale. L'immagine mostra uno strato fibroso attorno ai margini del difetto con nuova vascolarizzazione.

Sulla base dei risultati di questo singolo animale è sembrato, quindi, che il modello osteocondrale fosse il più promettente da utilizzare per l'applicazione clinica di una singola iniezione di idrogel considerato l'aspetto dell'osso dei siti riparati a 4 settimane con la presenza di alcune risposte biologiche.

Il danno locale al tessuto e la conseguente reazione infiammatoria possono giocare un ruolo importante nella guarigione dei difetti e nella risposta ai trattamenti. Nell'ambito dello stesso studio si è cercato di considerare l'impatto biologico di due differenti metodi chirurgici di creazione dei difetti.

La valutazione è stata eseguita tramite la revisione di uno studio precedente in cui un singolo difetto osteocondrale era stato indotto in ognuno dei condili medio distali femorali destro e sinistro, per un totale quindi di 2 difetti per pecora, localizzati nella regione sottoposta a carico del condilo femorale. Al fine di valutare anche le risposte biologiche indotte dalla tecnica chirurgica usata per la creazione del danno, sono state valutate due tecniche diverse (una detta *punch* e l'altra chiamata *drill*

chirurgico, basate su principi differenti) e l'evoluzione delle lesioni indotte tramite drill e punch a 4, 26 e 52 settimane di distanza dall'intervento.

Il *punch* è un sistema a compressione che permette la formazione di un difetto cilindrico con taglio netto mediante la percussione di un punzone contenente un orletto tagliente che permette la rimozione del nucleo di materiale (Figure 8.5, 8.6).



Figura 8.5 : *Punch*



Figura 8.6: Particolare della superficie di taglio

Il *drill* chirurgico invece è un trapano elettrico con un'apposita punta endoscopica cannulata che applica un taglio di tipo rotante più invasivo rispetto alla tecnica sopramenzionata (Figure 8.7, 8.8).



Figura 8.7 : *Drill*

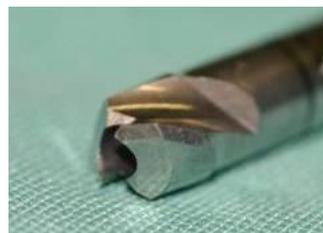


Figura 8.8: Particolare della punta

L'aspetto intra-operatorio dei difetti *drilled* e *punched* è risultato diverso, con il *punch* che ha procurato un taglio più netto e margini più distinti dei difetti sulla superficie della cartilagine. Il *drill* ha prodotto un aspetto notevolmente più irregolare attorno le pareti dei difetti e sono stati osservati alcuni danni alla cartilagine adiacente. Queste differenze sono dovute ai diversi meccanismi di taglio dei due sistemi: il *punch* è un taglio netto verticale mentre il *drill* è un taglio rotante che è in grado di produrre maggiore abrasione e un maggior incremento di temperatura. Questi fattori possono

contribuire a un aumento del trauma nel tessuto circostante i difetti creati con il *drill* che hanno presentato un ovvio danno della cartilagine. Il *punch* inoltre produce una base più piatta del difetto rispetto al *drill* fornendo così una più larga area di contatto per impianti con base piana. Grazie alle analisi successive, lo studio ha dimostrato come la creazione di un difetto che attraversi completamente lo spessore della cartilagine con un *punch* fornisca una risposta di guarigione superiore allo stesso approccio realizzato mediante un *drill*. Inizialmente il *drill* causa una guarigione spontanea più aggressiva, con un maggior riempimento dei difetti anche se perlopiù con tessuto fibroso. Al contrario il metodo meno aggressivo del *punch* provoca una minima riparazione del tessuto a 4 settimane. Quindi la tecnica con il *punch* consente ai ricercatori un maggior controllo della valutazione in vivo di uno specifico trattamento e del processo di guarigione.

Tale studio inoltre ha evidenziato che i difetti creati non hanno riportato una guarigione spontanea con cartilagine ialina nemmeno dopo 52 settimane. Il tessuto riparato a 26 settimane (Figura 8.9) e 52 settimane (Figura 8.10) era formato per la maggior parte da tessuto fibroso e neo-cartilagine non organizzata, non di alta qualità come la normale cartilagine ialina.

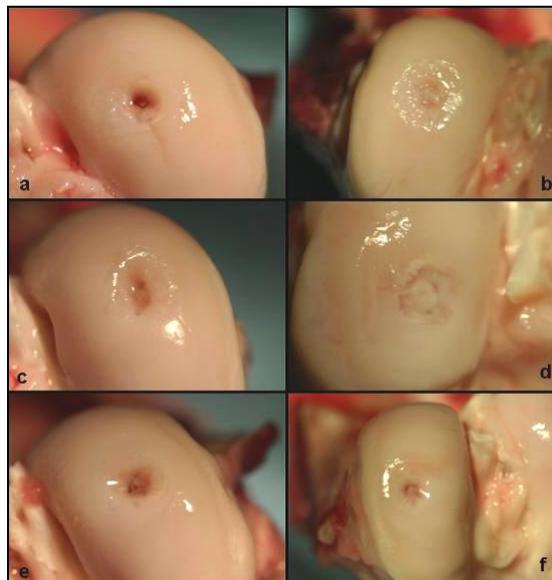


Figura 8.9 : aspetto macroscopico dei difetti drilled (a,c,e) e punched (b,d,f) dopo 26 settimane. I difetti punched hanno una quantità visibilmente maggiore di tessuto riparato nei difetti, tuttavia nessuno è totalmente guarito.

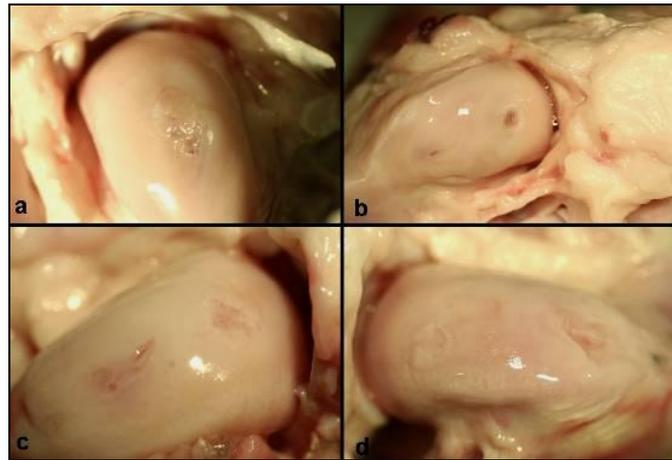


Figura 8.10 : aspetto macroscopico dei difetti *drilled* (a,c) e *punched* (b,d) dopo 52 settimane. Si nota che 3 dei 4 difetti hanno una quantità sostanziale di tessuto di riparazione disorganizzato che riempie il difetto. Si nota inoltre la presenza di lesioni superficiali secondarie sul difetto.

Sulla base delle prove effettuate è stato quindi possibile concludere che lo strumento più adatto per la creazione di difetti nel tessuto è il punch perché permette di creare un danno controllato e limitato e consente quindi una miglior guarigione. Partendo da tale presupposto si è cercato di individuare un modello di danno da poter utilizzare per testare l'efficacia dell'idrogel di CMCA nella rigenerazione tessutale. Delle due tipologie di difetti analizzate in precedenza nessuna risulta adatta: il singolo difetto condrale infatti non evidenzia significative risposte di guarigione da parte del tessuto e nemmeno l'applicazione dell'idrogel può avere notevole effetto. Il difetto di tipo osteocondrale invece, grazie all'induzione di sanguinamento e quindi afflusso di cellule staminali derivate dal midollo osseo e altre cellule, presenta una risposta notevole se combinata a uno stress meccanico, generalmente il carico, che favorisce l'osteogenesi. Questo tipo di metodica tuttavia non è applicabile nel caso di iniezione di idrogel date le caratteristiche stesse del gel e la sua funzione di *shock absorbing* che inibisce gli effetti di carico. È risultato necessario quindi individuare un modello che presentasse caratteristiche intermedie tra i due tipi di difetti. Una delle tecniche riportate in letteratura è la microfrattura [Mithoefer *et al.*, 2006]: essa consiste nella creazione di un difetto condrale superficiale di area non superiore ai 4 cm² all'interno del quale vengono creati con un punteruolo altri difetti di tipo osteocondrale distanti tra loro 3-4 mm (Figura 8.11). Questo tipo di danno ha mostrato ottimi risultati nella rigenerazione tessutale, tuttavia proprio per questo motivo, ossia per la buona risposta

a prescindere dall'applicazione di idrogel o altri riempitivi, è già di per sé considerata una pratica terapeutica e non può essere utilizzata per il nostro progetto. Una risposta positiva del tessuto all'applicazione dell'idrogel di CMCA su un danno creato seguendo questo modello, infatti, non potrebbe essere attribuita all'azione del gel ma proverrebbe dalla metodica di creazione dei difetti non consentendo, quindi, la raccolta di dati utili per la caratterizzazione dell'idrogel.

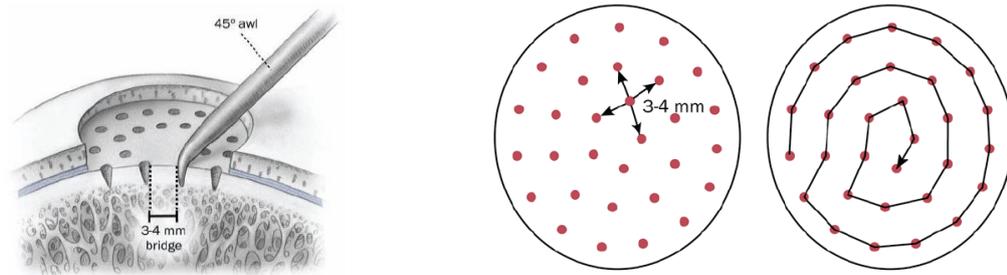


Figura 8.11 : schematizzazione della microfrattura.

Poste queste considerazioni il modello che si è scelto di applicare, in quanto si avvicina al modello suddetto senza presentare la stessa proprietà terapeutica, prevede la creazione di due difetti concentrici: l'uno condrale di diametro maggiore (5 mm) e all'interno uno osteocondrale (profondo 2 mm) di diametro pari a 2 mm (Figura 8.12).

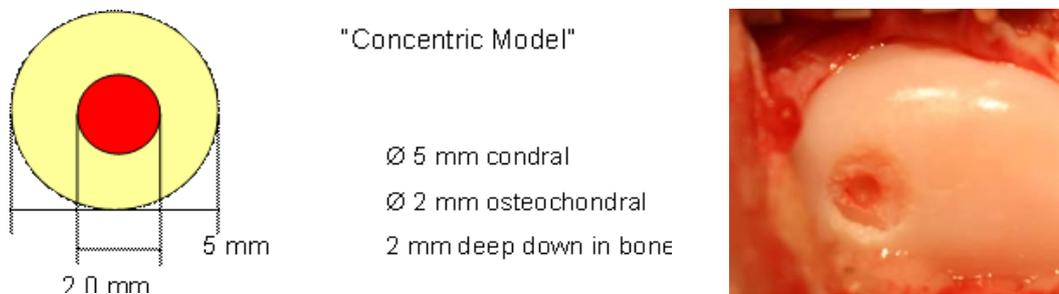


Figura 8.12: modello di danno concentrico.

Preso atto di tutti i risultati precedenti, si è proceduto con le prove di impianto: uno studio completo, tuttora in corso, è stato allestito su 3 gruppi di pecore, per un totale di 15 esemplari, per valutare la risposta in vivo all'applicazione dell'idrogel di CMCA.

Gli obiettivi specifici dello studio sono:

- confrontare le analisi del sangue prima e dopo l'intervento in tutti gli animali per garantire che non ci siano reazioni sistemiche avverse dovute alla presenza dell'idrogel;
- effettuare un'autopsia dettagliata per esaminare il fegato, i reni, il cuore e garantire l'assenza di reazioni avverse dovute alla presenza dell'idrogel;
- documentare e classificare l'aspetto macroscopico del sito chirurgico (regione sottoposta a carico del condilo femorale mediale);
- documentare e classificare l'aspetto macroscopico dell'intero condilo femorale nonché della tibia prossimale e del menisco;
- eseguire l'analisi istologica del campione decalcificato incluso nella paraffina del sito chirurgico (condilo mediale femorale) nonché del condilo laterale femorale, la tibia prossimale mediale e il menisco mediale.

Lo studio è condotto presso il laboratorio di ricerca chirurgica e ortopedica dell'università del New South Wales; le pecore (15 pecore adulte di 2-3 anni) vengono seguite e monitorate per tutta la durata del progetto; sono effettuate le analisi del sangue prima dell'intervento mediante il quale sono stati creati i difetti nella regione del condilo mediale femorale secondo il modello precedentemente analizzato. A una settimana dall'intervento si è proceduto, oltre a nuovi prelievi di sangue, all'iniezione, per ogni pecora, di 5 millilitri di idrogel di CMCA in un ginocchio e di 5 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) per controllo nell'altro (Figura 8.13). Gli esemplari vengono poi sacrificati a diverse distanze di tempo dall'iniezione, in particolare 13, 27 e 53 settimane.



Figura 8.13: preparazione dei siti e iniezione di idrogel di CMCA e soluzione fisiologica.

Le Tabelle 8.1 e 8.2 riassumono la struttura dello studio:

Tabella 8.1: Progetto di studio.

Progetto di studio - pecora			
	N° di animali	Iniezione	Analisi
Gruppo 1	5	1 settimana	13 settimane
Gruppo 2	5	1 settimana	27 settimane
Gruppo 3	5	1 settimana	53 settimane
<i>Totale:</i> 15			

Tabella 8.2: Costruzione dello studio in vivo.

Pecore	Endpoints							
	<i>Prelievo sangue prima dell'intervento</i>	<i>Prelievo sangue iniezione</i>	<i>Prelievo sangue al sacrificio</i>	<i>Analisi macroscopica</i>	<i>MRI</i>	<i>Esame Autoptico</i>	<i>Raggi X</i>	<i>Esame istologico</i>
Gruppo 1	N=5	N=5	N=5	N=5	N=3	N=5	N=5	N=5
Gruppo 2	N=5	N=5	N=5	N=5	N=3	N=5	N=5	N=5
Gruppo 3	N=5	N=5	N=5	N=5	N=3	N=5	N=5	N=5

Una raccolta fotografica dei siti chirurgici permette l'analisi macroscopica per la valutazione di eventuali reazioni avverse o infezioni. Tali siti sono classificati poi in base al grado di guarigione dei difetti:

- 0 – nessuna guarigione, difetto ancora presente;
- 1 – 25 % guarigione del difetto;
- 2 – 50 % guarigione del difetto;
- 3 – 75 % guarigione del difetto;
- 4 – 100% guarigione del difetto.

Lo stesso tipo di classificazione viene applicato all'interpretazione delle radiografie dei femori; mentre per le radiografie alle tibie sono applicati i seguenti parametri:

- 0 – nessun cambiamento;
- 1 – lievi cambiamenti;
- 2 – moderati cambiamenti;
- 3 – gravi cambiamenti.

In seguito al sacrificio vengono condotte anche le analisi istologiche dei campioni che sono decalcificati, sezionati, inclusi nella paraffina e colorati per le valutazioni. Per

questa analisi qualitativa si fa riferimento al sistema di valutazione denominato O'Driscoll modificato, proposto da [Frenkel *et al.*, 2005] (Figura 8.14).

HISTOLOGIC SCORING SCALE			Point value	
I.	Percentage hyaline articular cartilage:	80 - 100%	8	
		60 - 80%	6	
		40 - 60%	4	
		20 - 40%	2	
		0 - 20%	0	
II.	Structural Characteristics	A. Surface regularity:	Smooth and intact	2
			Fissures	1
			Severe disruption, fibrillation	0
		B. Structural integrity:	Normal	2
			Slight disruption, including cysts	1
			Severe lack of integration	0
		C. Thickness:	100% of normal adjacent cartilage	2
			50 - 100% of normal cartilage, or thicker than normal	1
			0 - 50% of normal cartilage	0
		D. Bonding to adjacent cartilage:	Bonded at both ends of graft	2
			Bonded at one end / partially at both ends	1
			Not bonded	0
		III.	Freedom from Cellular Changes of Degeneration:	Normal cellularity, no clusters
Slight hypocellularity, <25 chondrocyte clusters	1			
Moderate hypocellularity / hypercellularity, >25% clusters	0			
IV.	Freedom from Degenerative Changes in Adjacent Cartilage	Normal cellularity, no clusters, normal staining	3	
		Normal cellularity, mild clusters, moderate staining	2	
		Mild or moderate hypocellularity, slight staining	1	
		Severe hypocellularity, poor or no staining	0	
V.	Reconstitution of Subchondral Bone	Complete reconstitution	2	
		Greater than 50% reconstitution	1	
		50% or less reconstitution	0	
VI.	Bonding of Repair Cartilage to Denovo Subchondral Bone	Complete and uninterrupted	2	
		<100% but >50% complete	1	
		<50% complete	0	
VII.	Safranin-O Staining	Greater than 80% homogeneous positive stain	2	
		40-80% homogeneous positive stain	1	
		Less than 40% homogeneous positive stain	0	
		Total Score: _____		

[TOTAL MAXIMUM SCORE: 27]

Figura 8.14: Punteggio O'Driscoll modificato da Frenkel *et al.* per l'analisi qualitativa delle immagini istologiche.

All'atto della conclusione del presente progetto di ricerca i risultati dello studio non sono ancora stati completamente raccolti ed interpretati; ci si limita quindi ad una valutazione parziale sulla base del materiale fornito dall'Università del New South Wales.

Si riportano le immagini relative alle valutazioni macroscopiche dell'evoluzione del danno rispettivamente a 13 e 27 settimane:

- 13 settimane: immagini macroscopiche di 2 diversi esemplari. I difetti contrassegnati con *Left* sono stati trattati con idrogel di CMCA, quelli con *Right* con soluzione fisiologica (Figura 8.15)

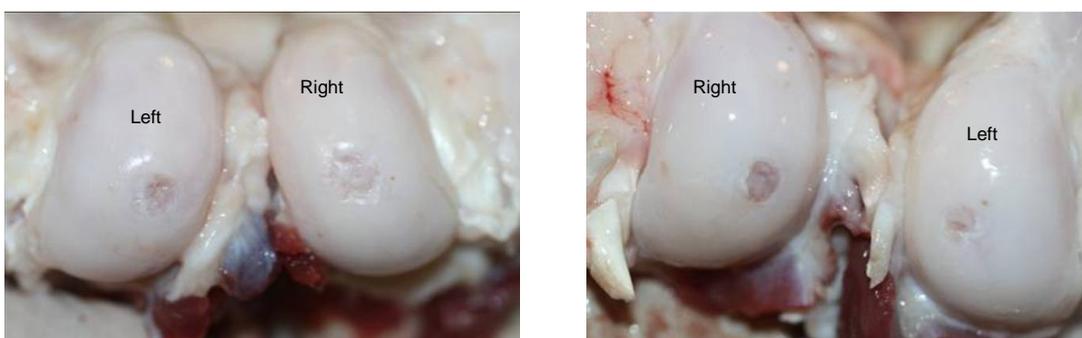


Figura 8.15 : immagini macroscopiche di 2 esemplari a 13 settimane. Left: difetti trattati con idrogel di CMCA; Right: difetti trattati con soluzione fisiologica.

- 27 settimane : immagini macroscopiche di 2 diversi esemplari a 27 settimane. I difetti contrassegnati con *Left* sono stati trattati con idrogel di CMCA, quelli con *Right* con soluzione fisiologica (Figura 8.16).

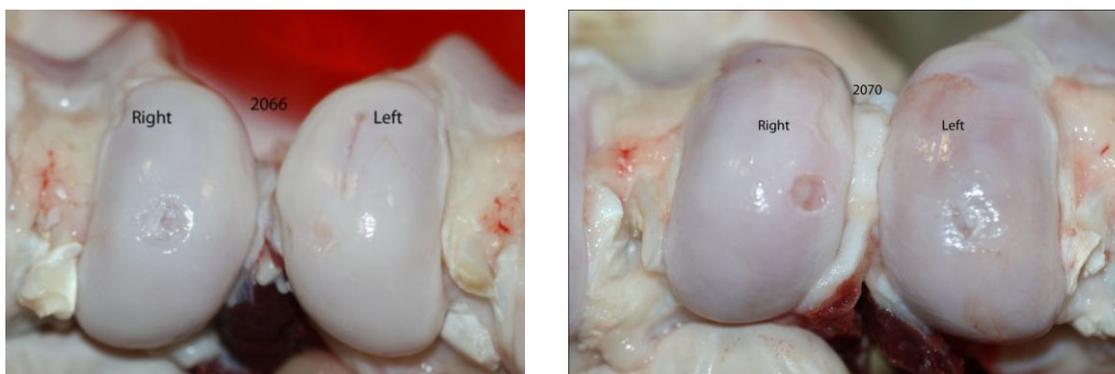


Figura 8.16 : immagini macroscopiche di 2 esemplari a 27 settimane. Left: difetti trattati con idrogel di CMCA; Right: difetti trattati con soluzione fisiologica.

La Figura 8.17 riporta le immagini istologiche a 13 settimane della componente tibiale: il difetto trattato con soluzione fisiologica presenta un'evidente frattura che attraversa l'orletto cartilagineo superficiale.

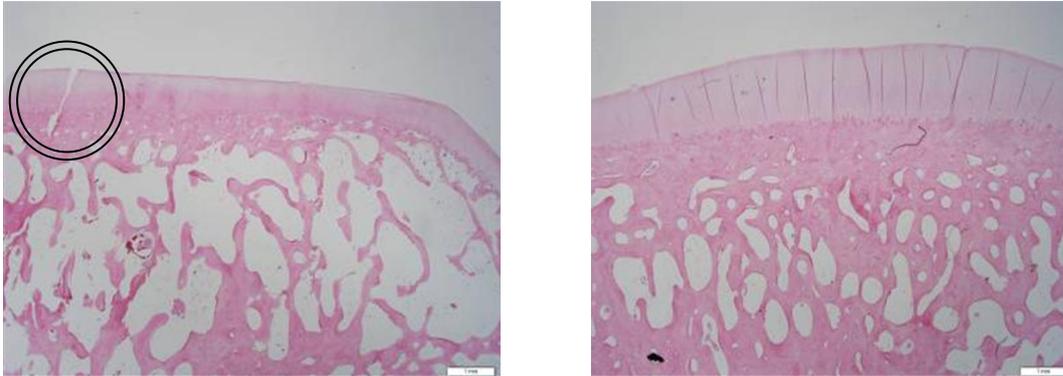


Figura 8.17 : immagini istologiche a 13 settimane di un difetto trattato con soluzione fisiologica (a sinistra) e di uno trattato con idrogel di CMCA (a destra).

Dai dati sinora a disposizione riguardo lo studio condotto emerge quanto segue:

- dal punto di vista della sicurezza della CMCA per utilizzo intrarticolare risulta che questo materiale sia ben tollerato in quanto non sono stati registrati fenomeni di ipersensibilità né immediata né a lungo termine. Tutti gli animali hanno mantenuto la deambulazione ed in nessun caso è stato registrato gonfiore, infiammazione e marcata dolorabilità dell'arto;
- dagli esami sia biochimici che ematologici non sono emerse alterazioni apprezzabili dei principali valori di riferimento;
- per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia, dai dati in possesso si evince che i difetti trattati con CMCA tendano a non estendersi sulle superfici condilari attigue e a non danneggiare le strutture cartilaginee della componente tibiale;
- per quanto concerne la rigenerazione del danno i dati al momento non sono sufficienti ad esprimere alcuna valutazione in merito.

Capitolo 9

Sterilizzazione e Packaging

L'ultima fase del progetto ha contemplato lo studio delle possibilità di confezionamento e di sterilizzazione dell'idrogel; trattandosi di un dispositivo medico per le applicazioni ortopediche è richiesto che ogni unità di prodotto sia sterile ossia esente da microrganismi vitali. A tal fine si rende necessario un processo in grado di inattivare, con un intervallo di confidenza noto (SAL, *sterility assurance level*), i contaminanti microbiologici per mezzo di un agente chimico o fisico. Per quanto un processo di sterilizzazione sia efficace, infatti, poiché la curva di inattivazione batterica è di tipo logaritmico (Figura 9.1), esiste sempre la probabilità che un microorganismo possa sopravvivere al trattamento, determinata dal numero e dalla resistenza dell'agente contaminante e dalle condizioni ambientali cui viene sottoposto durante il processo.

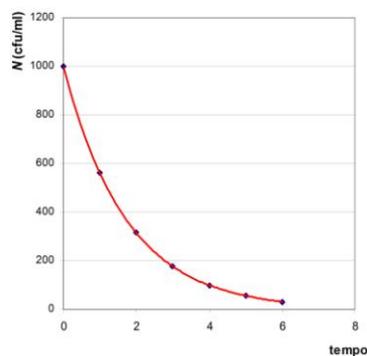


Figura 9.1: Cinetica di inattivazione microbica secondo la relazione $\log(N_0/N_t)=Kt$ dove N_0 e N_t rappresentano il numero di organismi vitali rispettivamente a inizio trattamento e al tempo t e il loro rapporto N_0/N_t definisce il grado di inattivazione.

Un dispositivo medico viene considerato sterile quando la probabilità di trovare in un lotto un campione con un microrganismo vitale è uguale o minore a 1×10^{-6} (ovvero SAL= 1×10^{-6}).

Data questa premessa sono state prese in considerazione tre tipologie differenti di modalità di sterilizzazione di un materiale per utilizzo medico impiantabile:

- *sterilizzazione mediante calore*
- *sterilizzazione mediante gas (EtO)*
- *sterilizzazione mediante radiazioni*

Fra le tipologie di sterilizzazione ossidativa a bassa temperatura vi è anche la *sterilizzazione con plasma di perossido di idrogeno*, che può costituire una valida alternativa alla sterilizzazione mediante EtO. Questo processo utilizza piccole quantità di H_2O_2 che vengono vaporizzate e convertite in plasma, ossia una miscela reattiva di ioni, elettroni ed atomi altamente energetici non legati tra loro, da una fonte di radiofrequenze. Gli ioni e radicali del plasma sterilizzano il materiale senza produrre residui tossici o emissioni. Rispetto alla sterilizzazione con EtO, il processo con plasma presenta notevoli vantaggi quanto a sicurezza e tempi di realizzazione; tuttavia questa tipologia di sterilizzazione non può essere presa in considerazione nell'ambito di questo progetto a causa dei limiti di applicabilità della stessa. Liquidi e polveri, infatti, sono incompatibili con la sterilizzazione al plasma e quindi l'idrogel di CMCA non può essere sottoposto a questo processo.

9.1 Sterilizzazione mediante calore

Il metodo più usato per la sterilizzazione è il vapore saturo sotto pressione: l'azione sterilizzante è esplicita dal calore che denatura le proteine batteriche e dall'elevata pressione (2 atm). La Farmacopea Ufficiale (XII ed.) indica un trattamento a 121° per 15 min. dal momento in cui viene raggiunta tale temperatura o in alternativa un ciclo a $134^\circ C$ ad una pressione di 3 atmosfere per un tempo dai 3 ai 5 minuti. In queste condizioni di norma vengono distrutte tutte le forme vegetative e la quasi totalità delle spore. Il trattamento viene eseguito in autoclave.

Nell'autoclave utilizzata per la sterilizzazione (Fedegari modello FOB3, Figura 9.2) le principali funzioni della sterilizzazione risultano governate da un controllore di processo gestito dall'utente mediante un pannello di comando. L'insieme delle principali attività che concorrono al trattamento dei materiali processati ai fini della loro sterilizzazione è denominato "processo di sterilizzazione", o più comunemente ciclo di sterilizzazione.



Figura 9.19: autoclave Fedegari FOB3 per la sterilizzazione mediante calore.

Nello specifico per l'idrogel il programma dell'autoclave da utilizzare è:

Programma 11 – SOLUZIONI (LIQUIDI) CON RAFFREDDAMENTO SPONTANEO

Questo programma è utilizzato per la sterilizzazione di liquidi/soluzioni in contenitori aperti o chiusi nel caso in cui non sia disponibile l'opzione raffreddamento forzato. Le principali fasi del ciclo sono:

Fase 8 – Preriscaldamento: per rimuovere parte dell'aria intrappolata nella camera per mezzo di flussi di vapore provenienti dallo scarico;

Fase 12 – Riscaldamento: permette di riscaldare il carico fino alla temperatura impostata;

Fase 13 – Sterilizzazione: per sterilizzare il carico a temperature definite per il tempo richiesto (120°C per 15 min);

Fase 14 – Raffreddamento spontaneo: il carico viene raffreddato al di sotto di una temperatura definita mentre la camera è pressurizzata. Il raffreddamento viene eseguito senza utilizzare acqua o altri mezzi di raffreddamento, viene quindi condotto "spontaneamente".

9.2 Sterilizzazione mediante gas (EtO)

Uno dei metodi utilizzati dall'industria sfrutta Ossido di Etilene (EtO) (Figura 9.3), un gas incolore e molto reattivo tanto da esplodere se miscelato con l'aria. Solitamente viene utilizzato assieme ad altri gas per ridurre tale pericolo. È tossico e mutageno, la concentrazione massima tollerabile è stata fissata a 50 ppm. Permea attraverso la carta e la plastica, e a fine trattamento è importante allontanarlo il più possibile dal prodotto (degasaggio).

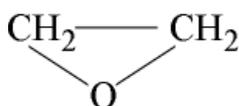


Figura 9.20: Formula di struttura della molecola dell'Ossido di Etilene.

Nella Tabella 9.1 vengono riportate le specifiche del ciclo di trattamento di sterilizzazione con EtO.

Tabella 9.1: specifiche del ciclo di sterilizzazione mediante Ossido di Etilene.

<i>Ciclo di trattamento EtO</i>	
Tempo di condizionamento	4 ore (±15 min.) (condizionamento con EtO)
Vuoto iniziale	80 (±10) kPa
Peso miscela	EtO 90.0 kg
Pressione	+100 (±10) kPa
Pressione	180 (±10) kPa
Temperatura	50 (±2) ° C
Umidità relativa	> 60 %
Concentrazione EtO	321 g/m ³
Tempo di esposizione	16 ore (±15 min.)
Vuoto finale	80 (±10) kPa
N° cicli di lavaggio	3

9.3 Sterilizzazione mediante radiazioni

Il processo di sterilizzazione mediante radiazioni è dovuto al danno che le radiazioni causano al DNA cellulare. Si possono usare due diversi tipi di radiazione:

- Radiazione Gamma: sono emesse da isotopi radioattivi di Co e Cs, hanno forte potere penetrante;
- Radiazione Beta: sono elettroni accelerati generati da un sistema non radioattivo e quindi più sicuro. Il flusso è controllabile così come l'intensità della radiazione emessa. La profondità della penetrazione deve essere calcolata in base allo spessore e alle caratteristiche del prodotto da trattare.

Per comodità e disponibilità di apposita strumentazione, sull'idrogel di CMCA si è scelto di testare il processo di sterilizzazione con radiazione Beta (Tabella 9.2).

Tabella 9.2: specifiche del ciclo di sterilizzazione con radiazione Beta.

<i>Caratteristiche sterilizzazione con radiazione Beta</i>	
Energia del fascio	10 MeV
Potenza del fascio	20 kW (max)
Corrente media del fascio	270 mA
Frequenza di riferimento della potenza	500 kHz (max)
Finestra di scansione regolabile	da 40 a 80 cm
Omogeneità della scansione	± 5 %

Essendo il progetto tuttora in via di sviluppo non si è ancora avuto modo di effettuare test completi sulle diverse procedure di sterilizzazione al fine di individuare con precisione se e in quale modo esse influiscano sulla struttura e le proprietà dell'idrogel. La definizione del metodo ottimale unitamente alla forma di stoccaggio (idratato o liofilizzato) e la tecnica di applicazione che saranno scelte per il dispositivo, permetteranno di individuare e validare il processo di sterilizzazione più idoneo.

9.4 Packaging primario

Contestualmente al processo di sterilizzazione, il packaging o confezionamento è uno step molto importante, dal momento che permette il trasporto del prodotto in

diversi luoghi e tra persone, mantenendone però inalterate le condizioni di sterilità, perciò deve essere valutato e differenziato in base al processo di sterilizzazione applicato.

Tutte le operazioni di confezionamento devono essere effettuate in una Clean Room ISO classe 7, un ambiente con un livello basso e controllato di inquinanti ambientali al fine di ridurre al minimo la contaminazione (Figura 9.4).



Figura 9.21: clean Room ISO classe 7 di Lima-Lto S.p.A.

Per poter applicare la sterilizzazione mediante calore all'idrogel è stato necessario individuare il packaging adeguato. Dopo una serie di valutazioni sui contenitori disponibili sul mercato, analisi delle loro caratteristiche e conseguente previsione e considerazione della loro applicabilità alla procedura, si è scelto come contenitore più adatto per l'utilizzo in autoclave una sacca in PVC di grado medicale per il confezionamento di soluzioni per uso parenterale (Figura 9.5)



Figura 9.22: Sacca in PVC per soluzioni di uso parenterale.

Tale prodotto è classificato come dispositivo per uso farmaceutico: da definizione un contenitore in materiale plastico per uso farmaceutico è un oggetto in plastica che contiene o è progettato per contenere un prodotto farmaceutico con il quale è, o può

essere, a contatto diretto. Secondo quanto indicato nella Farmacopea Europea (6^a ed.) il contenitore in plastica scelto per una particolare preparazione dovrebbe essere tale che:

- i componenti della preparazione, a contatto con il materiale plastico, non vengano adsorbiti in modo apprezzabile sulla sua superficie e non migrino all'interno della plastica o attraverso la stessa in modo significativo;
- il materiale plastico non ceda sostanze in quantità sufficiente ad influenzare la stabilità della preparazione o a presentare rischio di tossicità.

Tali requisiti sono stati considerati al fine di poter determinare, oltre ogni ragionevole dubbio, che eventuali modifiche a carico dell'idrogel post-sterilizzazione siano da imputare al processo stesso e non siano attribuibili a reazioni o interazioni con il contenitore.

I contenitori in plastica per soluzioni acquose per infusione parenterale sono sacche o bottiglie fabbricate utilizzando uno o più polimeri quali ad esempio polietilene, polipropilene e polivinile cloruro, se necessario con additivi, e devono resistere alle condizioni di sterilizzazione alle quali saranno sottoposti. La forma del contenitore e il metodo di sterilizzazione scelto sono tali che tutte le parti dei contenitori che possono venire a contatto con la soluzione siano sterilizzate e, dopo la chiusura, siano impermeabili ai microrganismi. Per una conveniente conservazione di certe preparazioni, il contenitore deve essere poi racchiuso in una busta di protezione.

Per il sistema di sterilizzazione con EtO, è necessario sviluppare un sistema di confezionamento che permetta al gas sterilizzante di penetrare, svolgere la propria azione tossica nei confronti di contaminanti biologici, ed infine di essere rimosso in fase di degasaggio. Il materiale che più si presta a questo genere di necessità è il Tyvek®, fabbricato con finissime fibre di polietilene pressofuse. Il Tyvek® deve la sua versatilità ad una insolita combinazione di proprietà fisiche: è leggero, sottile, flessibile e tenace, resistente all'abrasione e chimicamente inerte. E' un materiale che "respira" e che fornisce un'efficace barriera contro sporco e contaminanti, ma permette al gas sterilizzante di passare liberamente. Sfilaccia poco perciò è adatto all'utilizzo in camere bianche o sterili e la superficie relativamente liscia trattata con antistatico riduce notevolmente la contaminazione. Per la sterilizzazione con EtO sono utilizzate delle buste costituite da due fogli, uno in Tyvek® e l'altro in Polietilene (Figura 9.6).

All'interno della busta più piccola viene inserito il materiale; essa viene sigillata mediante una termosaldatrice a rulli (Figura 9.7), vi viene apposto l'indicatore della sterilizzazione EtO, ottenuto tagliando l'apposito nastro, e il tutto viene inserito nella busta più grande, a sua volta chiusa ermeticamente.



Figura 9.23: doppia busta in Tyvek® e Polietilene.



Figura 9.24: termosaldatrice a rulli.

9.5 Packaging in siringa

Generalmente i più comuni prodotti utilizzati per la viscosupplementazione sono somministrati tramite una serie di semplici iniezioni intrarticolari con cadenza settimanale. Per eseguire tale pratica è sufficiente l'utilizzo di una siringa come in Figura 9.8 composta da fusto e pistone in polipropilene e sigillo in gomma isoprenica. Considerata, poi, l'elevata viscosità del gel e la forte pressione che si viene a creare all'interno della siringa, per scongiurare l'espulsione dell'ago, risulta fondamentale la presenza del luer lock, che permette di ancorare l'ago al fusto della siringa tramite un connettore filettato (Figura 9.9).



Figura 9.25: siringa in polipropilene.



Figura 9.26: particolare del luer lock, sistema che assicura il fissaggio dell'ago al fusto della siringa.

In seguito a numerose prove di iniezione è stato valutato che un ago 18Gx1 ½ (1,20x40mm) fosse idoneo per iniettare l'idrogel di CMCA in modo agevole e sicuro.

A seguire sono riportate in Tabella 9.3 le specifiche tecniche utilizzate per le prime prove di riempimento.

Tabella 9.3: specifiche tecniche utilizzate per le prove di riempimento.

	Device component	DIN EN ISO 1043-1	Polymeric material
1	Barrel	PP	Polypropylene
2	Plunger	PP	Polypropylene
3	Piston seal	IR	Isoprene rubber, synthetic
4	External lubricant	--	Silicone fluid

Oltre al riempimento della siringa è necessario un confezionamento primario in grado di proteggerla da eventuali urti e da preservarla in condizioni di sterilità. A questo proposito è stato previsto un blister in materiale plastico PETG opportunamente formato per contenere al meglio la siringa e per avere ampie aree vuote che fungano da protezione in caso di lieve urto o schiacciamento. Tale blister viene sigillato con un foglio di Tyvek ® (Figura 9.10).



Figura 9.10: confezionamento della siringa in blister in PETG sigillato con foglio di Tyvek®.

Nel caso di applicazioni artroscopiche è stato previsto un sistema di confezionamento più complesso: secondo i prototipi considerati si è ipotizzato di inserire il gel in forma disidratata in una siringa a due compartimenti dotata di sistema

di miscelazione, consentendo, in tal modo la preparazione dell'idrogel da parte del chirurgo nei momenti immediatamente precedenti all'iniezione (Figura 9.11).



Figura 9.27: .siringa a due compartimenti (A e B) con sistema di miscelazione.

In dettaglio, nel compartimento a volume maggiore "A" viene alloggiato il gel sterile disidratato e quello a volume minore "B" è invece destinato ad una soluzione fisiologica tamponata, anch'essa sterile. Agendo su un'apposita ghiera posta in testa alla siringa è possibile trasferire la soluzione fisiologica dal compartimento B al compartimento A dove, tramite un'ancoretta alloggiata sul pistone di iniezione, è possibile eseguire la miscelazione tra i due componenti. Successivamente il posizionamento della ghiera sulla posizione "inject" consente l'iniezione del gel idratato. Anche in questo caso è stato previsto un sistema di connessione tramite luer lock in modo da poter prevedere la connessione tramite ago o tramite cannula.

E' stata considerata anche la possibilità di iniezione tramite siringhe a pistola ma è una soluzione che poi si è rivelata complessa e costosa. (Figura 9.12).



Figura 9.28: esempio di siringa a pistola.

Capitolo 10

Conclusioni

La prima fase del progetto può ritenersi conclusa in maniera positiva in quanto ha consentito di sviluppare un impianto pilota a partire da una procedura sintetica messa a punto e sviluppata su scala da laboratorio; la risoluzione delle principali problematiche riscontrate ha permesso, infatti, di individuare per l'idrogel di CMCA un processo di sintesi efficiente e ripetibile.

Particolari difficoltà nello sviluppo di questo progetto sono state incontrate nelle fasi di caratterizzazione del nuovo dispositivo. Trattandosi di un materiale innovativo e non essendovi quindi una linea guida che definisse le procedure da seguire, c'è stata la necessità di individuare tecniche di analisi e test che potessero fornire dati attendibili e utili per caratterizzare l'idrogel. L'approccio scelto inizialmente, quindi, è stato di utilizzare tecniche e strumentazioni note e di cui si detiene approfondita esperienza, solitamente utilizzate per altre tipologie di materiali; si è notato, tuttavia, che questo portava a spingersi verso branche sempre più specifiche che necessitano di tecniche particolari e mirate. Uno degli obiettivi per migliorare questo tipo di approccio al fine di ottenere una caratterizzazione valida, consiste, quindi, nel superare i limiti delle metodiche standard e nell'individuare nuove tecniche analitiche che rispondano al meglio alle esigenze di caratterizzazione in termini di attendibilità e riproducibilità dei risultati. Nonostante le difficoltà incontrate, la caratterizzazione effettuata ha permesso di confermare che il comportamento

dell'idrogel di CMCA è idoneo a sopportare e dissipare parzialmente le sollecitazioni che si creano a livello articolare a carico delle strutture cartilaginee.

Sebbene non si abbiano ancora a disposizione i risultati completi riguardo la sicurezza del nuovo biomateriale, come già riportato precedentemente, la prima fase del progetto ha evidenziato che la CMCA è ben tollerata e pare non suscettibile di indurre fenomeni di irritazione o sensibilizzazione, dimostrandosi quindi idonea per essere utilizzata come dispositivo medico.

Infine, per quanto riguarda l'efficacia nel trattamento intrarticolare dei danni indotti da osteoartrite, l'utilizzo della CMCA sembra fornire un valido trattamento per contrastare l'avanzamento della malattia e per procrastinare possibili interventi chirurgici a maggiore invasività.

Bibliografia

- Allen, E. e Krohn, K. (2000) "Adverse reaction to hylan GF-20", *J Rheumatol*, 27: 1572.
- Arokoski, J.P. *et al.* (2000) "Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading", *Scand J Med Sci Sports*, 10(4): 186-198.
- Arrich, J. *et al.* (2005) "Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta-analysis", *CMAJ*, 172: 1039-1043.
- Aruffo, A. (1996) "CD44: one ligand, two functions", *J Clin Invest*, 98: 2191-2192.
- Balazs, E.A. e Denlinger, J.L. (1993) "Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis", *J Rheumatol Suppl*, 39: 3-9.
- Balazs, E.A. (2004) "Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results", *Surg Technol Int*, 12: 278-289.
- Buckwalter, J.A. e Mankin, H.J. (1997) "Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interaction", *JBJS (Am)*, 79: 600-611.
- Buckwalter, J.A. e Mankin, H.J. "Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration and Transplantation", *JBJS (Am)*, 79: 612-632.
- Clark, R. *et al.* (1988) "Cryptic chemostatic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment", *J. Biol Chem*, 263: 12115-12123.
- Consiglio dell'Unione Europea, *Direttiva 93/42/CEE del 14 giugno 1993, concernente i dispositivi medici*, Gazzetta Ufficiale n. L 169 del 12/07/1993 pag 0001-0043.
- Council for Osteoarthritis Pain Management, *Management of Osteoarthritis Knee Pain: The state of Science*, 2008.

Council for Osteoarthritis Pain Management, *Osteoarthritis Pain Management Update, Special Report. Pain, Osteoarthritis and intra-articular hyaluronic acid...today and beyond*, 2007.

Dequeker, J. *et al.* (1995) "Bone density and osteoarthritis", *J Rheumatol Suppl*, 43: 98-100.

Dintenfass, L. (1963) "Lubrication in Synovial Joints: A theoretical Analysis. A rheological approach to the problems of joint movements and joint lubrication", *JBJS*, 45:1241-1256.

Ege, S. (1994) *Chimica organica. Struttura e reattività*. A cura di Vita Finzi, Jommi, Milano, edizioni Sorbona.

Food and Drug Administration *Hyalgan premarket approval application: summary of safety and effectiveness*.
<<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm115866.htm>> , 1997.

Food and Drug Administration: *Synvisc premarket approval application: summary of safety and effectiveness*.
<<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm115851.htm>> , 1997.

Frenkel, S.R. *et al.* (2005) "Regeneration of articular cartilage : Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants", *Osteoarthritis and cartilage*, 13: 798-807.

Frizziero, L. *et al.* (1998) "Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee: clinical and morphological study", *Clin Experim Rheumatol*, 16(4): 441-449.

Ghosh, P. e Guidolin, D. (2002) "Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent?", *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(1): 10-37.

Goldberg, V.M. e Buckwalter, J.A. (2005) "Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: evidence for disease-modifying activity", *Osteoarthritis cartilage*, 13(3): 216-224.

Hercules Inc. (1999) *Aqualon® - Sodium carboxymethylcellulose. Physical and Chemical properties*.

- Kellgren, J.H. e Lawrence, J.S. (1957) "Radiological assessment of osteoarthritis", *Ann Rheum Dis*, 16: 494-502.
- Laskin, D.L. *et al.* (1994) "Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like peptides", *Am. J. Respir. Cell Biol.*, 10: 58-64.
- Leone, G. *et al.* (2008) "An amidated carboxymethylcellulose hydrogel for cartilage regeneration", *J. Mater Sci: Mater Med*, 19: 2873-2880.
- Lussier, A. *et al.* (1996) "Viscosupplementation with hylan for the treatment of osteoarthritis; findings from clinical practice in Canada", *J Rheumatol*, 23: 1579-1585.
- Maneiro, E. *et al.* (2004) "The biological action of hyaluronan on human osteoarthritic articular chondrocytes: the importance of molecular weight", *Clin Exp Rheumatol*, 22(3): 307-312.
- Marino, A.A. *et al.* (2006) "Assessment of Immunologic Mechanisms for Flare Reactions to Synvisc®", *Clin Orthop Relat Res*, 442: 187-194.
- Martens, P.B. (2001) "Bilateral symmetric inflammatory reaction to hylan G-F 20 injection", *Arthritis Rheum*, 44: 978-979.
- McKee, M. *et al.* (1996) "Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages", *J. Clin Invest*, 98(10): 2403-2413.
- Migliore, A. e Granata, M. (2008) "Intra-articular use of hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis", *Clin Interv Aging*, 3(2): 365-369.
- Ministero della Salute, Italia (2007) *Dispositivi Medici. Aspetti regolatori e operativi*, Ministero della Salute, Direzione Generale dei Farmaci e Dispositivi Medici, Roma.
- Mithoefer, K. *et al.* (2006) "Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique.", *JBJS*, 88: 294-304.
- Ogston, A.G. e Stanier, J.E. (1953) "The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties", *J. Physiol*, 119: 244-252.
- Pelletier, J.P. e Martel-Pelletier, J. (1993) "The pathophysiology of osteoarthritis and the implication of the use of hyaluronan and hylan as therapeutic agents in viscosupplementation", *J Rheumatol Suppl*, 39: 19-24.
- Petrone, N. (2009) *Materiale didattico*, Università degli Studi di Padova.
- Puttick, M.P.E. *et al.* (1995) "Acute local reactions after intraarticular hylan for osteoarthritis of the knee", *J Rheumatol*, 22: 1311-1314.

Robbins, S. (2000) *Le basi patologiche delle malattie*. A cura di Cotran, Kumar, Collins. 6° edizione, Piccin.

UNI EN ISO 10993-1:2004, *Valutazione biologica dei dispositivi medici*.

Wright, V. e Dowson, D. (1976) "Lubrication and cartilage", *J. Anat*, 121: 107-118.